

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinische und Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Prof. Dr. med. U. Laufs)

Vorhofflimmern ist durch Lipidakkumulation und gesteigerte Glykogensynthese charakterisiert

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von: Gregor Schleider
geb. am 07.01.1986 in Bad Kreuznach

Inhaltsverzeichnis

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 Zusammenfassung | 1 |
| 1.1 Vorhofflimmern ist durch Lipidakkumulation und gesteigerte Glykogensynthese charakterisiert..... | 1 |
| 1.2 Atrial Fibrillation is characterized by Lipid Accumulation and increased Glycogen Synthesis..... | 2 |
| 2 Einleitung..... | 4 |
| 2.1 Epidemiologie, Merkmale und Ätiologie von Vorhofflimmern..... | 5 |
| 2.2 Myokardiales Remodeling bei Vorhofflimmern | 6 |
| 2.3 Die AMP-aktivierte Proteinkinase im Myokard | 9 |
| 2.4 Myokardialer Fettsäuremetabolismus | 10 |
| 2.4.1 Aufnahme von Fettsäuren | 10 |
| 2.4.2 β -Oxidation | 11 |
| 2.5 Myokardialer Glukosemetabolismus | 12 |
| 2.5.1 Glukoseaufnahme | 12 |
| 2.5.2 Glykolyse | 13 |
| 2.5.3 Glykogensynthese | 13 |
| 2.6 Apoptoseparameter im Myokard | 14 |
| 2.7 Atriale Elektrophysiologie und Morphologie des Aktionspotentials bei Vorhofflimmern | 15 |
| 3 Fragestellung | 16 |
| 3.1 Hintergrund | 16 |
| 3.2 Zielsetzung..... | 16 |
| 4 Material | 17 |
| 4.1 Antikörper..... | 17 |
| 4.1.1 Primärantikörper | 17 |
| 4.1.2 Sekundärantikörper | 18 |
| 4.2 Radioaktiv markierte Substanzen | 18 |
| 4.3 Geräte | 19 |
| 4.4 Verbrauchsmaterialien | 20 |
| 4.5 Medien, Lösungen, Puffer..... | 21 |
| 4.6 Chemikalien und sonstige Reagenzien..... | 22 |
| 4.7 Auswertungs- und Statistikprogramme | 23 |
| 5 Methoden..... | 24 |
| 5.1 Humane Vorhofproben..... | 24 |
| 5.1.1 Patientencharakteristika | 24 |
| 5.1.2 Proteinextraktion..... | 25 |
| 5.1.3 PAS- Diastase- Färbung..... | 25 |
| 5.1.4 Immunhistologie | 27 |
| 5.2 Isolation und Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten | 27 |
| 5.3 Elektrische Stimulation neonataler Rattenkardiomyozyten..... | 29 |
| 5.4 Spezielle Proteinverarbeitung | 32 |
| 5.4.1 Isolation und Proteinextraktion neonataler Rattenkardiomyozyten | 32 |
| 5.4.2 Membran/Cytosol Auftrennung | 32 |
| 5.4.3 Proteinbestimmung nach Lowry | 32 |
| 5.5 Western Blot Analyse..... | 33 |
| 5.5.1 Gelelektrophorese | 33 |
| 5.5.2 Protein-Transfer..... | 34 |
| 5.5.3 Antikörperinkubation..... | 34 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.5.4 | GAPDH als Ladekontrolle | 35 |
| 5.5.5 | Phosphorylierungsstellen wichtiger Proteine | 35 |
| 5.6 | Quantifizierung der Aufnahme von Glukose und Fettsäuren | 35 |
| 5.6.1 | Aktivitätsmessung der Proben | 36 |
| 5.7 | Messungen von transmembranösen Ca^{2+} -Strömen | 36 |
| 5.8 | Photometrische Messungen von Aktionspotentialen | 37 |
| 6 | Ergebnisse: Humanes Vorhofmyokard..... | 38 |
| 6.1 | Expression und Phosphorylierung der Calmodulin Kinase II und der AMP-aktivierten Proteinkinase sind bei Vorhofflimmern gesteigert | 38 |
| 6.2 | Myokardialer Fettsäuremetabolismus bei Vorhofflimmern | 40 |
| 6.2.1 | Gesteigerte Membran/Cytosol Translokation der Fettsäuretranslokase CD36 bei Vorhofflimmern | 40 |
| 6.2.2 | Reduzierte Phosphorylierung der Acetyl-CoA Carboxylase bei Vorhofflimmern | 41 |
| 6.2.3 | Immunhistochemischer Nachweis des adipose differentiation-related protein bei Vorhofflimmern | 42 |
| 6.3 | Myokardialer Glukosemetabolismus bei Vorhofflimmern | 43 |
| 6.3.1 | Reduzierte SNAP-23 Membrantranslokation und gesteigerte GLUT4 Expression bei Vorhofflimmern | 43 |
| 6.3.2 | Bei Vorhofflimmern initiiert Akt durch Phosphorylierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 eine Glykogenspeicherung | 45 |
| 6.3.3 | Vorhofflimmern führt zu einer gesteigerten Speicherung und intrazellulären Akkumulation von Glykogen | 47 |
| 6.4 | Aktivierung der proapoptotischen Signalkaskade bei Vorhofflimmern | 48 |
| 7 | Ergebnisse: neonatale Rattenkardiomyozyten | 50 |
| 7.1 | Änderungen der Ca^{2+} -Homöostase bei neonatalen Rattenkardiomyozyten durch irreguläre Stimulation | 50 |
| 7.2 | Reduzierte Aktionspotentialdauer und Amplitude von Aktionspotentialen bei neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Stimulation | 52 |
| 7.3 | Bei irregulär stimulierten neonatalen Rattenkardiomyozyten ist die Phosphorylierung der Calmodulin Kinase II und der AMP-aktivierten Proteinkinase gesteigert | 54 |
| 7.4 | Myokardialer Fettsäuremetabolismus bei irregulärer Stimulation | 55 |
| 7.4.1 | Nach irregulärer Stimulation war die Membrantranslokation des Fettsäuretransporters CD36 und die Aufnahme von Fettsäuren bei neonatalen Rattenkardiomyozyten gesteigert | 55 |
| 7.4.2 | Irreguläre Stimulation reduziert die Phosphorylierung der Acetyl-CoA Carboxylase | 57 |
| 7.5 | Myokardialer Glukosemetabolismus bei irregulärer Stimulation | 58 |
| 7.5.1 | Irreguläre Stimulation von neonatalen Rattenkardiomyozyten reduziert deren Expression von SNAP-23, das Membran/Cytosol Verhältnis von GLUT4 und die globale Glukoseaufnahme | 58 |
| 8 | Diskussion..... | 60 |
| 9 | Literaturverzeichnis..... | 65 |
| 10 | Dank..... | 73 |

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| A, mA | Ampere, Milliampere |
| Abb. | Abbildung |
| ACC | Acetyl-CoA Carboxylase |
| ADRP | adipose differentiation-related protein |
| AKT | = PKB (Proteinkinase B) |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AMPK | AMP-aktivierte Proteinkinase |
| AP | Aktionspotential |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AV-Knoten | Atrio-Ventikulärer Knoten |
| bax | bcl-2-associated X protein |
| bcl-2 | b cell lymphoma 2 |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | circa |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| CaMKII | Calmodulin Kinase II |
| CD36 | Fettsäuretranslokase (FAT) |
| Ci, µCi | Curie, Mikrocurie |
| CPT I | Carnitin-Acyl-Transferase I |
| Cyt. | Cytosol |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMEM | Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| FABPpm | plasmalemmal fatty acid-binding protein |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| FATP | fatty acid-binding protein |
| FS | Fettsäuren |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3`Phosphat-Dehydrogenase |
| GLUT1 | Glukosetransporter Subtyp 1 |
| GLUT4 | Glukosetransporter Subtyp 4 |
| GSK | Glykogen Synthase Kinase 3β/α |
| h | Stunde |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperaziny)-Ethansulfonsäure |
| Hz | Hertz (Frequenz) |
| ICaL | L-Type Calcium Current |
| Ito | Ca ²⁺ -unabhängiger transienter K ⁺ -Auswärtsstrom |
| KCL | Kaliumchlorid |
| kg, g, mg, µg | Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm |
| Kontr. | Kontrolle |
| l, ml, µl | Liter, Milliliter, Mikroliter |
| LHO | linke Herzvorhoföhren |
| M, mM, µM | Molar, Millimolar, Mikromolar |
| MCD | Malonyl-CoA-Decarboxylase |

| | |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Mem. | Membran |
| min. | Minute |
| mm, µm, nm | Millimeter, Mikrometer, Nanometer |
| MW | Mittelwert |
| n | Anzahl |
| NAD | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid |
| NSF | N-Ethylmaleimid-sensitive Fusionsprotein |
| n.s. | nicht signifikant |
| NCS | neonatal calf serum |
| NRVM | neonatal rat ventricular myocytes |
| PAS | Periodic Acid Schiff Reaktion |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PDH | Pyruvat-Dehydrogenase |
| PFK | Phosphofruktokinase |
| PP2A | Protein Phosphatase 2 |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| RYR2 | Ryanodine Rezeptor |
| SDS | Dodecylsulfat Natriumsalz |
| SNAP-23 | synaptosomal-associated-protein 23 |
| SR | Sinusrhythmus |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| t-SNARE | target membrane soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor-attachment protein receptors |
| u.a. | unter anderem |
| U/min. | Umdrehungen pro Minute |
| V | Volt |
| VAMP | Vesikel assoziiertes Membranprotein |
| v-SNARE | vesicle soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor-attachment protein receptors |
| VHF | Vorhofflimmern |

1 Zusammenfassung

1.1 Vorhofflimmern ist durch Lipidakkumulation und gesteigerte Glykogensynthese charakterisiert

Hintergrund: Der kardiomyozytäre Lipid- und Glukosestoffwechsel könnte im Rahmen des kardialen Remodelings bei Vorhofflimmern (VHF) eine relevante Rolle spielen. VHF ist durch irreguläre Kontraktion atrialer Kardiomyozyten und einen gesteigerten Energiebedarf charakterisiert. Die metabolischen Veränderungen bei VHF sind bislang nur unzureichend verstanden. Daher wurde der Einfluss einer Arrhythmie auf den Lipid- und Glukosemetabolismus in humanem linkem Vorhofmyokard und in Kardiomyozyten neonataler Ratten (NRVM) untersucht.

Ventrikuläre Kardiomyozyten neonataler Ratten wurden mittels Feldstimulation regulär und irregulär jeweils mit der gleichen Anzahl an Kontraktionen pro Minute stimuliert. Sowohl die Aktionspotentialdauer als auch die atriale effektive Refraktärzeit waren nach irregulärer Stimulation verkürzt. Fluoreszenz-Aufnahmen der Kardiomyozyten zeigten einen gesteigerten diastolischen Ca^{2+} -Gehalt nach irregulärer Stimulation. Dies war mit einer gesteigerten Phosphorylierung der Calmodulin-Kinase II (CaMKII) und der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und einer gesteigerten Membran/Cytosol Translokation der Fettsäuretranslokase assoziiert. Die Membran/Cytosol Translokation des im Myokard regulierten Glukosetransporters (GLUT4) hingegen war nach irregulärer Stimulation reduziert. Dies resultierte in einer gesteigerten ^{14}C -Palmitoyl-Säure und einer verminderten ^3H -Glukose Aufnahme. Die Inhibierung der AMPK reduzierte die durch Arrhythmie verursachten metabolischen Veränderungen.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen des Zellkulturmodells war auch in humanen atrialen Myozyten von Patienten mit VHF die Expression und Phosphorylierung der CaMKII und der AMPK verglichen mit Myozyten von Patienten mit Sinusrhythmus (SR) gesteigert. Die Membran/Cytosol Translokation von CD36 war bei VHF gesteigert, die Phosphorylierung der Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), dem Schlüsselenzym der β -Oxidation, vermindert. Der immunhistochemische Nachweis

des adipose differentiation-related protein bei VHF deutete auf eine intrazelluläre Lipidakkumulation hin. Durch die Lipidakkumulation nahm die Membrantranslokation des Synaptosomal-assoziierten Protein 23 und damit auch die des GLUT4 ab. Die Phosphorylierung der Glykogensynthase-kinase-3 war bei VHF gesteigert und in der PAS- Diastase- Färbung zeigte sich eine intrazelluläre Glykogenakkumulation. Bei VHF zeigte sich eine gesteigerte Expression der Proteinkinase B (Akt), die unter anderem an der Regulation der Apoptose beteiligt ist. Die Expression des proapoptotischen Proteins bcl-2-associated X protein (bax) war gesteigert, die des antiapoptotischen Proteins b cell lymphoma 2 (bcl-2) blieb unverändert.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass VHF durch eine Aktivierung der AMPK gekennzeichnet ist. Die dadurch gesteigerte Aufnahme und verminderte Oxidation von Fettsäuren führt zu einer Lipidakkumulation. Diese reduziert die Glukoseaufnahme in Kardiomyozyten. Diese metabolischen Veränderungen führen zu einer gesteigerten Apoptose und tragen so zu dem myokardialen Remodeling bei VHF bei.

1.2 Atrial Fibrillation is characterized by Lipid Accumulation and increased Glycogen Synthesis

Objective: To characterize the influence of arrhythmia on glucose and fatty acid (FA) metabolism in cardiomyocytes and human left atrial myocardium.

Background: Atrial fibrillation (AF) is characterized by irregular contractions of atrial cardiomyocytes and increased energy demand. The changes of energy metabolism in the atria and during AF and their functional importance are incompletely understood because cell culture- and animal models focussing on simulating arrhythmia are scarce.

Methods and Results: Compared to regular pacing, irregular (pseudo-random variation at the same number of contractions/Minute) pacing of neonatal rat cardiomyocytes induced shorter action potential durations and effective refractory periods and increased diastolic $[Ca^{2+}]_c$. This was associated with activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and AMP-activated protein

kinase (AMPK). Membrane expression of fatty acid translocase (FAT/CD36) and ^{14}C -palmitic acid uptake were augmented while membrane expression of glucose transporter subtype 4 (GLUT4) as well as ^3H -glucose uptake were reduced. Inhibition of AMPK prevented these arrhythmia-induced metabolic changes. Consistent with these findings samples of left atrial myocardium of patients with AF compared to matched samples of patients with sinus rhythm showed up-regulation of CaMKII and AMPK and increased membrane expression of FAT/CD36. Western blot analyses of LA of patients with AF showed a reduced phosphorylation of the acetyl-CoA carboxylase (ACC). The protein of the adipose differentiation-related protein (ADRP) detected an lipid accumulation in LA of patient with AF. These alterations leads to an reduced membrane expression of synaptosomal-associated-protein 23 (SNAP-23) and also GLUT4. Phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 (GSK-3), responsible for glycogen synthesis, was increased in LA of patients with AF compared to SR. Protein kinase B (Akt) regulates cellular proliferation and apoptosis. Western Blot analyses of LA of patients with AF showed an increased expression of Akt while phosphorylation remained unchanged. The expression of the pro-apoptotic protein bax was increased in LA of patients with AF while the expression of the anti-apoptotic protein bcl-2 was unaffected.

Conclusions: Irregular pacing of cardiomyocytes increases diastolic $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and activation of CaMKII and AMPK resulting in lipid accumulation, reduced glucose uptake and increased glycogen synthesis. These metabolic changes are accompanied by an activation of pro-apoptotic signalling pathways.

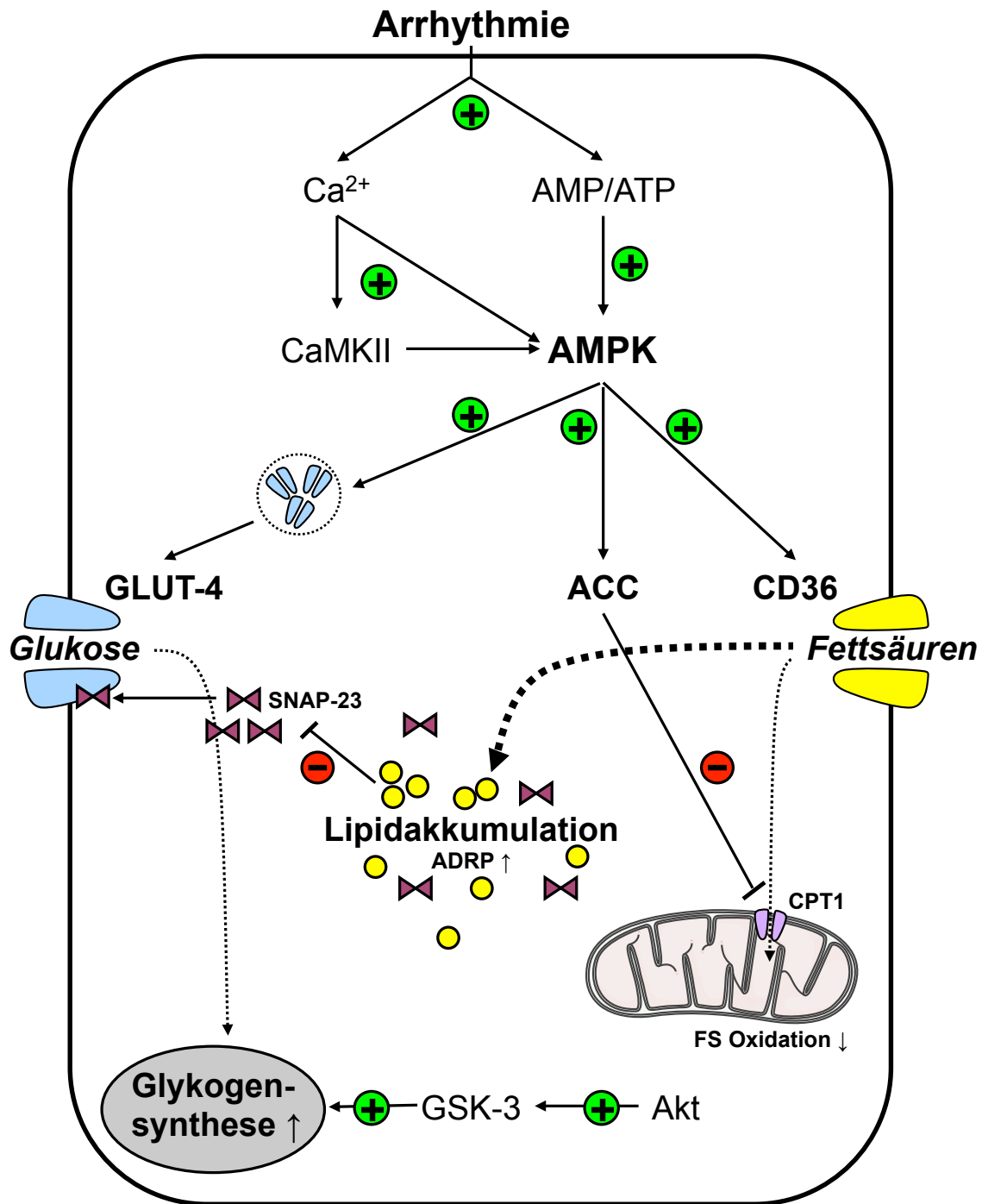


Abb. 1: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Doktorarbeit zum Glukose- und Fettsäurestoffwechsel bei Vorhofflimmern. Eine Arrhythmie induziert einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Über eine gesteigerte Aktivität der CaMKII und AMPK kommt es zu einer gesteigerten Membranexpression von CD36 und zur Steigerung der Fettsäureaufnahme. Die reduzierte Aktivität der ACC vermittelt eine reduzierte Aktivität von CPT1 und eine verminderte Oxidation von Fettsäuren. Die gesteigerte Aufnahme und reduzierte Oxidation von Fettsäuren führt zu einer Lipidakkumulation, was wiederum die Membranexpression von SNAP-23 reduziert. Durch die reduzierte Membranexpression von SNAP-23 ist die über die AMPK gesteuerte Membrantranslokation von GLUT4 und damit auch die gesamte Glukoseaufnahme reduziert. Die gesteigerte Expression und Phosphorylierung von Akt steigert die Phosphorylierung der GSK-3 und führt zu einer gesteigerten Glykogensynthese.

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie, Merkmale und Ätiologie von Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen. Das Auftreten von VHF korreliert mit dem Alter, die Prävalenz liegt im Alter von 50 Jahren bei 0.5 % und steigt auf annähernd 10 % bei den über 80-jährigen an. Eine erhöhte Mortalität resultiert bei VHF insbesondere aus einer beeinträchtigten Hämodynamik und aus thrombembolischen Ereignissen. VHF ist somit einer der wichtigsten Risikofaktoren für das Auftreten eines Schlaganfalls ¹. Die Ursache der Entstehung von VHF ist häufig eine hämodynamische oder mechanische Vorhofbelastung durch verschiedene kardiovaskuläre Funktionsstörungen wie Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Perikarditis, Mitralklappenstenose aber auch eine Behandlung mit Antiarrhythmika und anderen Medikamenten. Diese Faktoren gilt es zu beseitigen oder zu kontrollieren. Das weitere Vorgehen in der Behandlung von VHF, besteht in der Kontrolle einerseits des Rhythmus, andererseits der Frequenz. Bei der Rhythmuskontrolle ist das Ziel eine dauerhafte Konversion des VHF in einen Sinusrhythmus (SR) durch elektrische oder medikamentöse Kardioversion. Die Katheterablation stellt eine weitere Möglichkeit zur Behandlung des VHF dar. Die medikamentöse Frequenzkontrolle soll eine möglichst physiologische Herzfrequenz in Ruhe und unter Belastung gewährleisten. Hierbei ist zusätzlich eine Antikoagulation zur Prävention thrombembolischer Ereignisse notwendig. Die dauerhafte Antikoagulation geht mit einer Einschränkung der Lebensqualität einher. Die stationäre Versorgung und eine komplizierte medikamentöse Behandlung verursachen jährlich Kosten von mehreren Milliarden Euro ².

Bei SR entstehen die einzelnen Erregungen physiologischer Weise im Sinusknoten und können an die körperlichen Bedingungen angepasst werden. Dabei kann die Herzfrequenz, aus einer Ruhefrequenz von ca. 60 Schlägen pro Minute, bei starker Belastung auf bis zu 200 Schlägen pro Minute ansteigen. Bei VHF können Schlagfrequenzen der Vorhofzellen von 400 - 600 Schlägen pro Minute beobachtet werden.

2.2 Myokardiales Remodeling bei Vorhofflimmern

Die Pathogenese von VHF ist gekennzeichnet durch elektrisches, strukturelles und kontraktiles Remodeling. Elektrisches Remodeling kann schon nach kurzen Phasen von VHF auftreten, strukturelle Veränderungen treten hingegen erst nach länger andauerndem VHF auf. Bei isoliertem, kurzzeitigem VHF ist das elektrische Remodeling reversibel, strukturelle Änderungen jedoch nicht ^{3,4}. Die metabolischen Veränderungen bei VHF sind bislang nur unzureichend verstanden, der Lipid- und Glukosestoffwechsel könnte im Rahmen des kardialen Remodelings bei VHF eine relevante Rolle spielen.

Elektrisches Remodeling:

Nach aktueller Auffassung beruht VHF auf dem gleichzeitigen Vorhandensein multipler Reentry-Kreisläufe. Bei kurzen, schnell aufeinander folgenden Impulsen können schon kleine refraktäre Areale eine geregelte Reizweiterleitung behindern und so die Entstehung von Reentrykreisläufen begünstigen ^{5,6}. Das elektrische Remodeling führt zu einer ungeordneten Erregungsausbreitung in den Vorhöfen. Moe et al. formulierte schon um 1960 die „Multiple Wavelet“-Hypothese ^{7,8}. VHF beruht demnach auf vielen unabhängigen Erregungskreisen, die mobil um refraktäre Gewebeareale kreisen und einmal initiiert ihre Größe und Lokalisation je nach Leitungseigenschaften des Gewebes ändern können. Einzelne Erregungskreise können hierbei spontan erliegen, andere neu auftreten. Je mehr einzelne Reentrykreisläufe auftreten, desto stabiler wird das VHF und umso geringer ist die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Konversion ^{9,10}. Daher erhöht eine schnelle Stimulation der Vorhöfe, über einen längeren Zeitraum, das Risiko eines Rhythmuswechsels hin zum VHF. „Vorhofflimmern erzeugt Vorhofflimmern“ ¹¹.

Bei VHF kommt es auch zu einer Modulation der Genexpression des L-Typ Ca^{2+} -Kanals ($\text{I}_{\text{Ca,L}}$). Er ist bei VHF der am meisten beeinflusste Ionenkanal und wird in seiner Expression deutlich reduziert ¹². Daraus resultiert ein erhöhter diastolischer Ca^{2+} -Gehalt was zu einer Überladung der Myozyten mit Ca^{2+} und einer Verminderung des systolischen Ca^{2+} -Transienten führt.

In Proben humaner Vorhöfe von Patienten mit VHF liegt eine gesteigerte Expression und Phosphorylierung der Calmodulin Kinase II (CaMKII) vor, was zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Ryanodine Rezeptoren (RyR2) führt^{13,14}. Daraus resultiert ein gesteigerter Ca^{2+} -Strom über das Sarkoplasmatische Retikulum, der den diastolischen Ca^{2+} -Gehalt im Cytosol ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) erhöht¹³. Dies führt zu verkürzten Aktionspotentialen (APs) und zu einer verminderten Anpassungsfähigkeit der Aktionspotentialdauer (APD)^{15,16}. Eine verkürzte APD und atriale effektive Refraktärzeit (AERP) begünstigen VHF (Abb. 2)^{12,17}.

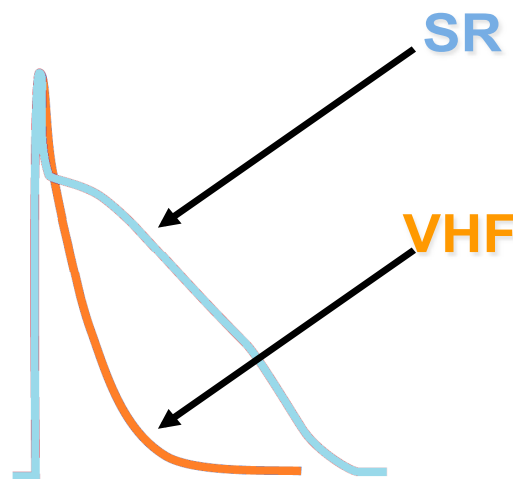


Abb. 2: Änderungen der Morphologie des Aktionspotentials bei Vorhofflimmern (elektrisches Remodeling): Aktionspotentialdauer (APD) und Atriale Effektive Refraktärzeit (AERP) von Kardiomyozyten sind bei VHF verkürzt. (SR = Sinusrhythmus; VHF = Vorhofflimmern). Modifizierte Grafik, Original nach U. Schotten, S. Verheule, P. Kirchhof, and A. Goette, "Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal.," *Physiological reviews*, vol. 91, no. 1, pp. 265–325, Jan. 2011.

Strukturelles Remodeling:

Strukturelles Remodeling beschreibt Umbauvorgänge in der Morphologie atrialer Kardiomyozyten und wurde zusammen mit dem elektrischen und kontraktilem Remodeling von Morillo et al. bei VHF beschrieben¹⁸. Durch einen Verlust der Kontraktionsfähigkeit kommt es zur Dilatation des atrialen Myokards¹². Weitere strukturelle Veränderungen in atrialen Myozyten bei VHF sind die perinukleäre

Glykogenakkumulation, der Verlust zentraler Sarkomere (Myolyse), die veränderte Expression von Connexinen und Strukturänderungen der Mitochondrien (Abb. 3) ¹⁹. Die häufigsten pathologischen Veränderungen bei VHF gehen mit Fibrosierung oder mit dem Verlust an Muskelmasse der Vorhöfe einher. Diese strukturellen Veränderungen findet sich nicht in allen atrialen Zellen gleichermaßen, vielmehr kann man stark veränderte Myozyten direkt neben funktionsfähigen, normal konfigurierten Zellen finden ^{20,19}.

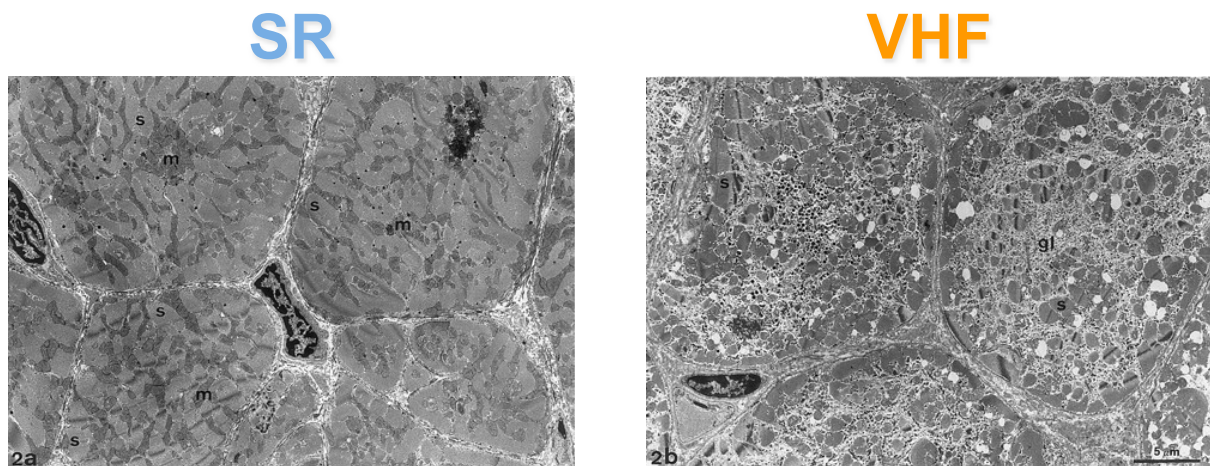


Abb. 3: Strukturelles Remodeling bei Vorhofflimmern: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Vorhofmyokard von Ziegen in 2000x Vergrößerung: Sarkomere (s); Mitochondrien (m) Glykogen (gl). (SR = Sinusrhythmus; VHF = Vorhofflimmern).

J. Ausma, M. Wijffels, F. Thoné, L. Wouters, M. Allessie, and M. Borgers, "Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat.," *Circulation*, vol. 96, no. 9, pp. 3157–63, Nov. 1997.

Kontraktiler Remodeling:

Kontraktiler Remodeling beschreibt den Verlust der atrialen Kontraktionskraft durch den Rückgang des Ca^{2+} -Einstroms der auch einige Zeit nach einer Kardioversion noch bestehen bleibt ^{21,22}. Logan et al. beobachtete den Verlust der Kontraktilität nach Kardioversion eines VHF, der zu einer verminderten Transportfunktion der Vorhöfe führte ²³. Schon kurze Episoden von VHF können zu einer kontraktilen Dysfunktion führen. Der Rückgang der atrialen Funktionsfähigkeit bei VHF korreliert eng mit dem elektrischen Remodeling ^{24,25,21}.

Metabolisches Remodeling:

Der Energiebedarf bei VHF ist gegenüber SR gesteigert. Dies spiegelt sich in einem erhöhten Adenosinmonophosphat-/ Adenosintriphosphat-Verhältnis (AMP-/ ATP-Verhältnis) wieder ²⁶. Auch die atriale Perfusion nimmt bei VHF zu, die Dehnbarkeit des Myokards hingegen nimmt ab ²⁷. Das Remodeling des linken Ventrikels z.B. bei Hypertrophie geht mit Änderungen des Glukose- und Fettsäuremetabolismus einher ^{28,29}. Ein Mangel an Sauerstoff oder anderer Stress kann im Myokard des linken Ventrikels zu einer Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) führen ³⁰. Das metabolische Remodeling bei VHF ist nur unzureichend erforscht, Veränderungen bezüglich des Glukose- und Fettsäurestoffwechsels sind bis heute nicht bekannt.

2.3 Die AMP-aktivierte Proteinkinase im Myokard

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, mit der Hauptaufgabe verschiedene Organsysteme, darunter auch das Myokard, an unterschiedliche metabolische Bedingungen anzupassen. Hierzu kann die AMPK das Energieangebot über verschiedene Signalübertragungswege steuern, und leistet einen entscheidenden Anteil an der Regulation des Energiehaushaltes ^{31,32}. Indem die AMPK energieverbrauchende Prozesse hemmt und gleichzeitig energiebringende Prozesse induziert, können Energiedefizite in der Zelle ausgeglichen werden ³³. Die AMPK ist ein heterotrimeres Protein, aufgebaut aus drei Untereinheiten (α, β, γ). Im Herzen ist die α_2 -AMPK die dominierende aktive Proteinkinase ³⁴. Die AMPK kann über verschiedene Wege in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Bei erhöhtem Gehalt an intrazellulärem AMP oder erniedrigtem Gehalt an intrazellulärem ATP steigt die Aktivität der AMPK an. AMP aktiviert zusätzlich eine übergeordnete Kinase, die AMPK-Kinase (AMPKK). Über eine Phosphorylierung der α -Untereinheit induziert die AMPKK eine zusätzliche Aktivitätssteigerung der AMPK ^{35,36}. Ferner verhindert die Bindung durch AMP eine Dephosphorylierung und somit Inaktivierung der AMPK durch Proteinphosphatasen ³⁷.

Ein weiterer Mechanismus zur Aktivierung der AMPK ist die vermehrte Phosphorylierung im Myokard schon bei physiologischen Konzentrationen langkettiger Fettsäuren, da der größte Anteil des ATP-Gehalts im Herzen durch die Oxidation von Fettsäuren gedeckt wird ^{38,39}. Zusätzlich kann die Aktivität der AMPK durch Ca^{2+} -abhängige Stoffwechselvorgänge über die CaMKII und die CaMKK und direkt durch Ca^{2+} gesteigert werden ^{40,41}. Wichtige Schlüsselenzyme verschiedener Stoffwechselwege, unter anderem auch die Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), werden von der AMPK direkt beeinflusst. Auch die Expression der transmembranösen Transportproteine der Familie der Glukosetransporter (GLUT) wird bei Aktivierung der AMPK gesteigert und so die Glukoseaufnahme gefördert ⁴². Zusätzlich beeinflusst die AMPK die Transkription verschiedener Gene, die in den Glukose und Fettstoffwechsel involviert sind. Welche Rolle die AMPK bei der Entstehung von metabolischen Veränderungen bei VHF einnimmt ist unklar.

2.4 Myokardialer Fettsäuremetabolismus

2.4.1 Aufnahme von Fettsäuren

Durch die Oxidation von Fettsäuren (FS) decken Kardiomyozyten physiologischerweise, abhängig von der Konzentration freier Fettsäuren im Plasma, 60-90 % ihres Bedarfes an ATP. Den größten Anteil an der Aufnahme von Fettsäuren mit bis zu 80 % leistet die Fettsäuretranslokase (CD36), die in Vesikeln verpackt vorliegt. Bei Bedarf induziert die AMPK die Translokation der CD36 in die Membran der Kardiomyozyten und steigert so die Aufnahme von Fettsäuren ⁴³. CD36 wird besonders im Skelett- und Herzmuskel exprimiert. Bei Bindung eines Liganden wird der Komplex aus Protein und Ligand internalisiert. Eine untergeordnete Rolle bei der Fettsäureaufnahme spielen das fatty acid-binding protein (FATP) und das plasmalemmal fatty acid-binding protein (FABPpm) (Abb. 4) ⁴⁴. Der Transport von FS ist in elektrisch stimulierten Kardiomyozyten größer als in nicht stimulierten Zellen da die Translokation von CD36 durch elektrische Stimulation und durch Energiemangel gesteigert wird ^{45,46}.

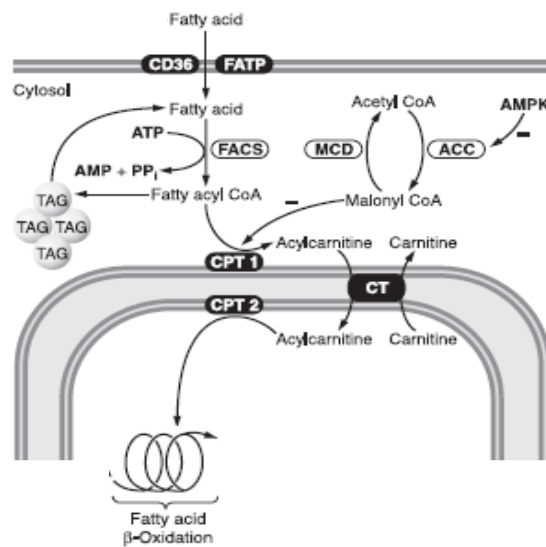


Abb. 4: Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. (modifiziert) Fettsäurestoffwechsel von der Aufnahme in die Zelle bis zur β -Oxidation im Mitochondrium. G. D. Lopaschuk, J. R. Ussher, C. D. L. Folmes, J. S. Jaswal, and W. C. Stanley, "Myocardial fatty acid metabolism in health and disease.," *Physiological reviews*, vol. 90, no. 1, pp. 207–58, Jan. 2010.

2.4.2 β -Oxidation

Die β -Oxidation läuft vorrangig im Mitochondrium ab und bildet Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid ($\text{NADH} + \text{H}^+$), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2) und Acetyl-CoA. Ein wichtiger Regulationsmechanismus der Oxidation von Fettsäuren ist die an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierte Carnitin-Acyl-Transferase I (CPT-I). Da Fettsäuren im Cytoplasma aktiviert werden und diese aktivierten FS die Lipidmembran nicht durchdringen können müssen die aktivierten FS aktiv über die Mitochondrienmembran transportiert werden. Dies erfolgt mit Hilfe der CPT-I und der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase ⁴⁷. Die ACC, ein Schlüsselenzym der Fettsäurebiosynthese, katalysiert die chemische Addition von Kohlenstoffdioxid an Acetyl-CoA, wobei Malonyl-CoA entsteht, welches die CPT-I hemmt ⁴⁸ (Abb.3). Die AMPK steigert neben der Aufnahme von Fettsäuren auch deren Oxidation. Letzteres induziert die AMPK durch Phosphorylierung und damit Inaktivierung der ACC. Bei Energiemangel kann die AMPK die β -Oxidation steigern, bei Energieüberschuss hingegen hemmen ^{49,50}. Eine gesteigerte Aufnahme und reduzierte Oxidation von FS führt zu intrazellulärer Lipidakkumulation. Ein sensibler Marker zur Bestimmung der

Lipidakkumulation ist das adipose differentiation-related protein (ADRP). ADRP ist ein Lipid Droplet Coat Protein, dessen Aufgabe darin besteht, den Metabolismus von sogenannten Lipiddroplets zu koordinieren^{51,52}. Eine Lipidakkumulation führt zu einer „Lipidtoxizität“ und geht mit einer gesteigerten Apoptose einher^{53,54,55}.

2.5 Myokardialer Glukosemetabolismus

2.5.1 Glukoseaufnahme

Das Myokard ist in der Lage verschiedene Substrate zur Energiegewinnung zu nutzen. Hierbei spielen vor allem Fettsäuren, Kohlenhydrate, Ketonkörper und Aminosäuren eine Rolle. Je nach Substrat- und Sauerstoffangebot, Belastung und hormonellen Einflüssen ist das Herz in der Lage, den Anteil der zur Energiegewinnung verwendeten Substrate zu regulieren, wobei physiologischerweise nur etwa 30 % des benötigten ATP aus Glukose generiert werden. Bei Myokardschädigung hingegen ist das Herz besonders auf Glukose als Substrat zur Energiegewinnung angewiesen^{56,57}. Glukose wird mittels transmembranöser Transportproteine der Familie der Glukosetransporter (GLUT) in das Myokard transportiert. Die größte Bedeutung für die Energieversorgung des Myokards haben die Transporter GLUT1 und GLUT4. GLUT1 ist vorrangig für die basale Glukoseaufnahme zuständig, GLUT4 ist der hauptsächlich regulierte Transporter adulter Kardiomyozyten⁵⁸. Eine Aktivierung der AMPK bewirkt eine gesteigerte Membrantranslokation besonders von GLUT4⁵⁹. Die Translokation von GLUT4 aus intrazellulären Vesikeln zur Zellmembran wird vorwiegend durch die Interaktion von „target membrane soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor-attachment protein receptors“ (t-SNAREs) und „vesicle soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor-attachment protein receptors“ (v-SNAREs) bewerkstelligt. T-SNAREs sitzen als Rezeptoren in der Zielmembran während v-SNAREs als Liganden in der Vesikelhülle dienen⁶⁰. Zu den SNARE-Proteine zählen unter anderen das N-Ethylmaleimid-sensitive Fusionsprotein (NSF) und die synaptosomal-assoziierten Proteine (SNAPs)⁶¹. GLUT4 Vesikel enthalten unter anderem auch das vesikelassoziierte Membranprotein 2 (VAMP2), das bei der Anlagerung der Vesikel

an die Plasmamembran mit dem t-SNARE Protein Syntaxin 4 interagiert ⁶². Zur Fusion der GLUT4-Vesikel mit der Plasmamembran werden noch weitere Proteine benötigt, hier spielt SNAP-23 eine wichtige Rolle ⁶³. Intrazellulär wird die Glukose entweder als Glykogen gespeichert oder als Glukose-6-Phosphat energiebringend verstoffwechselt.

2.5.2 Glykolyse

Der initiale Prozess der intrazellulären Glukoseverwertung ist die Glykolyse. Hierbei werden zunächst zwei ATP pro Mol Glukose gebildet. Bei der Glykolyse kann auch unter anaeroben Bedingungen Energie gewonnen werden. Im gesunden Herzen entstehen so bereits 10 % des gesamten ATP. Darüber hinaus wird in der Glykolyse zusätzlich Pyruvat gewonnen. Dieses wird intramitochondrial durch die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) zu Acetyl-CoA decarboxyliert, welches dann in den Zitratzyklus eingeschleust werden kann. Unter aeroben Bedingungen liefert ein Mol Glukose dann 32 Moleküle ATP. Das Schlüsselenzym der Glykolyse ist die Phosphofruktokinase-1 (PFK-1), die unter ATP-Verbrauch den ersten, irreversiblen Schritt von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-1,6-Bisphosphat katalysiert ⁶⁴. Der Gehalt an Fruktose-2,6-Bisphosphat, dem wichtigsten positiven Regulator der PFK-1, wird durch die PFK-2 kontrolliert ⁶⁵. Fruktose-2,6-Bisphosphat steigert die Affinität der PFK-1 zu Fruktose-6-Phosphat und reduziert den inhibitorischen Effekt, den ATP auf die PFK-1 ausübt. Die PFK-2 wird von der AMPK phosphoryliert und aktiviert, was zu einem Anstieg von Fruktose-2,6-Bisphosphat führt ^{66,64}.

2.5.3 Glykogensynthese

Glykogen ist eine leicht mobilisierbare Speicherform der Glukose und dient dem Myokard als Energiepuffer. Bei der Glykogensynthese werden zum Zweck der Glukosespeicherung einzelne Glukosemoleküle an Glykogenketten angehängt. Gegenüber Fettsäuren benötigt Glykogen zur Bereitstellung der Selben Energiemenge die dann in Kontraktionen umgesetzt wird weniger Sauerstoff.

Die Speicherkapazität für Glykogen im Muskel ist jedoch begrenzt ⁶⁷. Unter physiologischen Bedingungen wird zur schnellen Energiegewinnung Glykogen aerob verstoffwechselt. Sind die Glykogenspeicher erschöpft werden Triglyceride und Fettsäuren oxidiert ^{68,69}.

Die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) ist eine in Säugetieren ubiquitär in zwei Isoformen, GSK-3 α (51 kDa) und GSK-3 β (47 kDa), vorkommende Serin/ Threonin-Proteinkinase. Die GSK-3 phosphoryliert die Glykogensynthase, die dadurch inaktiviert wird, und greift so in die Regulation der Glykogensynthese ein. In aktiven Myokardzellen ist die GSK-3 dephosphoryliert und damit aktiv ⁷⁰. Durch Phosphorylierung inaktiviert die Proteinkinase-B (PKB = Akt) die GSK-3 und initiiert die Speicherung der Glukose in Form von Glykogen ⁷¹.

Unter Ischämie ist Glykogen das wichtigste Substrat zur Energiegewinnung. Die AMPK induziert am Herz die Glykolyse und schaltet energieverbrauchende Prozesse wie die Glykogensynthese ab ⁷².

2.6 Apoptoseparameter im Myokard

Apoptose ist eine exakt regulierte, energieverbrauchende Form von programmiertem Zelltod, der von der Zelle selbst aktiv durchgeführt wird. Diese Form des Zelltods unterliegt einer strengen Kontrolle ⁷³. Die Proteine der bcl-2-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose und können in verschiedenen Untergruppen eingeteilt werden. Eine Apoptose inhibierende Untergruppe schließt unter anderem das bcl-2 ein. Bcl-2 ist ein Hauptvertreter anti-apoptotischer Proteine und kann zu einer Suppression der Apoptose beitragen ⁷⁴. Ein wichtiges Regulationsenzym des Zellzyklus, p53, ist in der Lage die Expression pro-apoptotisch wirkender Mitglieder der bcl-2 Familie wie z.B. bax zu stimulieren ⁷⁵. Dies führt über einer Freisetzung von apoptoseinduzierenden Faktoren, wie z.B: Cytochrom-C aus den Mitochondrien ins Cytoplasma, zum programmierten Zelltod. Ein Marker für das Altern einer Zelle ist p16. Es hemmt Cyclin-abhängige Kinasen und verhindert damit einen Übertritt von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus ⁷⁶.

Der programmierte Zelltod bei Kardiomyozyten kann unter anderem durch Herzinsuffizienz aber auch durch Herzrhythmusstörungen ausgelöst werden ^{77,78}. Apoptose bei VHF ist charakterisiert durch eine verminderte Balance zwischen bax und bcl-2 mit einem erhöhtem Level des proapoptotischen bax und einem niedrigen Level des antiapoptotischen bcl-2 ⁷⁹.

2.7 Atriale Elektrophysiologie und Morphologie des Aktionspotentials bei Vorhofflimmern

Bosch et al. beschrieb in Zellen von Patienten mit VHF gegenüber SR eine verkürzte Aktionspotentialdauer (APD) und eine verminderte Adaption der Repolarisation. Die Morphologie des Aktionspotentials ändert sich deutlich, unter anderem kommt es zu einem Verlust des Plateaus ⁸⁰. Eine schnelle Stimulation führt zu deutlichen, qualitativ ähnlichen Veränderungen der APD₃₀ und der APD₇₀. Die Veränderungen der atrialen Elektrophysiologie könnten durch eine Modulation von Ionenkanälen bedingt sein, entweder durch Änderung der Expression oder der Eigenschaften bestimmter Kanäle. Eine wichtige Rolle spielt hierbei der transmembranöse Ca²⁺-Strom und die intrazelluläre Ca²⁺-Homöostase. Folge eines verminderten Ca²⁺-Stroms ist ein verkürztes Plateau und damit eine verkürzte Gesamtdauer des Aktionspotentials. Auch ein kontraktiles Remodeling kann auf eine geminderte Aktivität der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle (I_{CaL}) zurückgeführt werden. Im Gegensatz zum I_{CaL}, von dem eine Reduktion von bis zu 70 % gezeigt werden kann und dem Ca²⁺-unabhängigen transientem K⁺-Auswärtsstrom (I_{to}), der fast in gleichem Ausmaß vermindert ist, bleiben die anderen Ströme weitestgehend unbeeinflusst ¹⁵.

3 Fragestellung

3.1 Hintergrund

Metabolische Veränderungen bei Vorhofflimmern (VHF) sind bislang weitgehend unbekannt. Der kardiomyozytäre Lipid- und Glukosestoffwechsel könnte im Rahmen eines metabolischen Remodelings bei VHF eine relevante Rolle spielen.

VHF ist durch vermehrte, unregelmäßige Kontraktionen gekennzeichnet. Der Einfluss einer Arrhythmie auf den myokardialen Stoffwechsel ist bislang unzureichend untersucht. Nicht zuletzt beruht dies auf einem Mangel an adäquaten Zellkulturmodellen, die isoliert eine Arrhythmie simulieren können.

3.2 Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, den Fettsäure- und Glukosemetabolismus bei VHF zu untersuchen. Dazu werden Gewebeproben von linksatrialem Myokard von Patienten mit VHF und Sinusrhythmus (SR) gegenübergestellt und analysiert. Sowohl die Aufnahme als auch die Verwertung von Fettsäuren und Glukose wollen wir anhand wichtiger Membrantransporter und Schlüsselenzyme und der dazugehörigen übergeordneten Proteinkinasen wie der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) charakterisieren.

Um die Auswirkungen einer Arrhythmie auf den kardiomyozytären Metabolismus zu untersuchen, wird ein Zellkulturmodell etabliert, welches neonatale Rattenkardiomyozyten (NRVM) mittels Feldstimulation stimuliert. Die Myokardzellen werden sowohl rhythmisch als auch arrhythmisch stimuliert, wobei ein spezielles Programm die gleiche Anzahl an Impulsen über den Versuchszeitraum sicherstellt. Auch hier wollen wir sowohl den Glukose- als auch den Fettsäurestoffwechsel analog zu den Versuchen an humanen Gewebeproben charakterisieren.

4 Material

4.1 Antikörper

4.1.1 Primärantikörper

| Antikörper | verwendete Konzentration | sek. AK | Hersteller | # |
|-----------------------------|-----------------------------|---------|----------------|-----------|
| p-ACC (Ser79) | 1:1000 / 5µl | rabbit | Cell-Signaling | 3661 |
| ADRP (AP125) | 1:500 / 10µl | mouse | Fitzgerald | 10R-A117 |
| Akt | 1:500 / 10µl | rabbit | Cell-Signaling | 9272 |
| p-Akt (Ser473) | 1:500 / 10µl | rabbit | Cell-Signaling | 9271 |
| α ₂ -AMPK (C-20) | 1:1000 / 5µl | goat | Santa Cruz | sc-19131 |
| p-AMPK (Thr172) | 1:1000 / 5µl | rabbit | Cell-Signaling | 2531 |
| bax (B-9) | 1:500 / 10µl | mouse | Santa Cruz | sc-7480 |
| bcl-2 (N-19) | 1:250 / 20µl | rabbit | Santa Cruz | sc-492 |
| CaMKII (H-300) | 1:1000 / 5µl | rabbit | Santa Cruz | sc-13082 |
| p-CaMKII (Thr286) | 1:1000 / 5µl | rabbit | Cell-Signaling | 3361 |
| CD36 (H-300) | 1:500 / 10µl | rabbit | Santa Cruz | sc-9154 |
| GAPDH (6C5) | 1:10000 / 0,5µl | mouse | Santa Cruz | sc-32233 |
| GLUT1 (H-43) | 1:500 / 10µl | rabbit | Santa Cruz | sc-7903 |
| GLUT4 (1F8) | 1:500 / 10µl | goat | Cell-Signaling | 2213 |
| p-GSK-3α/β (Ser 21/9) | 1:1000 / 5µl | rabbit | Cell-Signaling | 9327 |
| p16 (F-12) | 1:500 / 10µl | mouse | Santa Cruz | sc-1661 |
| p53 (FL-393) | 1:500 / 10µl | mouse | Santa Cruz | sc-6243 |
| SNAP-23 (A-5) | 1:500 / 10µl | mouse | Santa Cruz | sc-166244 |
| p-PP2A-C (A-5) | 1:500 / 10µl | mouse | Santa Cruz | sc-74580 |
| β-Tubulin (H-235) | 1:500 / 10µl | mouse | Santa Cruz | sc9104 |

Cell Signaling: Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Santa Cruz: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Fitzgerald: Fitzgerald Industries International, North Acton, MA, USA

4.1.2 Sekundärantikörper

| Antikörper | Konzentration | Hersteller | # |
|-------------------------------------|---------------|----------------------|----------|
| Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Konj. | 1:5000 | Bio-Rad Laboratories | 170-6516 |
| Goat Anti-Rabbit IgG-Peroxidase | 1:4000 | Sigma-Aldrich | A6154 |
| Rabbit Anti-Goat IgG-Peroxidase | 1:6000 | Sigma-Aldrich | A4174 |

Bio-Rad: Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Sigma-Aldrich: Sigma-Aldrich Chemie, München

4.2 Radioaktiv markierte Substanzen

| Produkt | spezifische Aktivität | Hersteller |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------|
| ¹⁴ C-Palmitoyl-Säure | 56 Ci/mmol | GE Healthcare, München |
| ³ H-Glukose | 51 Ci/mmol | GE Healthcare, München |

GE Healthcare: GE Healthcare, München

4.3 Geräte

| Gerät | Hersteller |
|------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Mikroskope: | |
| Olympus CK 2 Inverted phase contrast | Olympus Deutschland GmbH, Hamburg |
| Nikon SMZ 645 | Nikon GmbH, Düsseldorf |
| - mit Schott KL 1500 LCD Kaltlichtquelle | Schott AG, Mainz |
| Nikon Eclipse TS 100 / T1-SM / E600 | Nikon GmbH, Düsseldorf |
| Keyence BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop | KEYENCE Corporation, Osaka, Japan |
| Nikon E600 epifluorescence microscope | Nikon, Germany |
| Nikon TE2000-U | Nikon, Tokyo, Japan |
| Waagen: | |
| VIC-Series 0.01g Precision Balances | Acculab UK, Edgewood, NY |
| ALC-Series 0.0001g Analytical Balances | Acculab UK, Edgewood, NY |
| Zentrifugen: | |
| Biofuge pico | Heidolph Instruments, Schwabach |
| Kühlzentrifuge 1 K 15 | SIGMA Laborzentrifugen, Osterode am Harz |
| Megafuge 1,0 | Heraeus Holding, Hanau |
| Ultrazentrifuge L7-55 | Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA |
| - mit Ultrazentrifugenrotor TFT 70.38 | Kontron, Zürich, Schweiz |
| Zellkultur: | |
| Heracell 150 Cell Culture Incubator | Heraeus Holding, Hanau |
| Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12 | Heraeus Holding, Hanau |
| Sicherheitswerkbank Heraeus KS 12 | Heraeus Holding, Hanau |
| C-Pace EP | IonOptix, LLC, Milton, MA, USA |
| C-Dish CEP-100 | IonOptix, LLC, Milton, MA, USA |
| - mit EHV 100 | IonOptix, LLC, Milton, MA, USA |
| Kamera: | |
| Coolpix 4500 Digitalkamera | Nikon GmbH, Düsseldorf |
| weitere Geräte: | |
| Überkopfschüttler REAX 2 | Heidolph Instruments, Schwabach |
| Autoklaviergerät Tuttnauer 3850 EL | Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande |
| Eismaschine Scotsman Frimont MF 22 | Scotsman Frimont, Milano, Italien |
| Entwicklungsautomat | Curix 60 Agfa, Mortsel, Belgien |
| Metallblockthermostat HTMR-133 HLC | Biotech, Bovenden |
| Mini Trans-Blot Cell | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Mini-Protean Gelgießstand | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Mini Trans-Blot System | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| pH-Meter 526 | WTW GmbH, Weilheim |
| Spectrophotometer DU 730 | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Pipettierhilfe Pipetus Akku | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| Monochromator Polychrome IV | TILL Photonics, Gräfelfing, Germany |

| Gerät | Hersteller |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Schüttel- und Mischgerät Polymax | Heidolph Instruments, Schwabach |
| Schüttelwasserbad Typ 1086 | Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel |
| Szintillationcounter Wallac 1400 DAS | Wallac Scintillation Products, Wallac, Finnland |
| Stickstofftank Apollo 50 | Messer Griesheim, Krefeld |
| Stickstoffbehälter | GT 140 Air Liquide, Düsseldorf |
| Ultraschallreiniger Sonorex RK 31 0,9l | Bandelin electronics, Berlin |
| Vortexer VV3 | VWR International, Darmstadt |
| Eclipse Ti | Nikon GmbH, Düsseldorf |
| Cell Framing Adapter | IonOptix, LLC, Milton, MA, USA |
| Myo Cam-S | IonOptix, LLC, Milton, MA, USA |
| TC-324B Temp. Controller | Warner Instruments, Hamden, USA |
| Fluorescence System Interface | IonOptix, LLC, Milton, MA, USA |
| SIU 102 Stim. Unit | Warner Instruments, Hamden, USA |
| Power Pac 200 Power Supply | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Röntgenkassette 24x30cm | Dr. Goos-Suprema, Heidelberg |
| Scanner CanoScan D1250 V2F | Canon Deutschland, Krefeld |
| Potter | bBraun Melsungen AG, Melsungen |
| Schlittenmikrotom Leica RM2255 | Leica Microsystems, Wetzlar |
| RM 2255 Motorisches Mikrotom | Leica Biosystems Global Market. Buffalo, USA |
| DSI-200 / Myopacer | IonOptix, Milton, USA |

4.4 Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|---------------------------------------|------------------------------------------------|
| Falcon Cell Strainer (70 µm) | Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA |
| High Performance autoradiography film | GE Healthcare, München |
| Glasobjektträger | VWR International, Darmstadt |
| Kyroröhrchen Cyro.S | Greiner-bio.one, Frickenhausen |
| Mini-Trans-Blot Filterpapier | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Präzisionswischtücher | Kimberly-Clark, Koblenz |
| Pipettenspitzen (5 ml, 25 ml) | Greiner-bio.one, Frickenhausen |
| PP-Test-tubes (15 ml, 50 ml) | Greiner-bio.one, Frickenhausen |
| Thermanox Plastic Coverslips | Nunc, Rochester, NY, USA |
| Zellkulturschale (100 mm x 20 mm) | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellkulturschale Sechs-Well | Greiner-bio.one, Frickenhausen |
| Zellkulturschale P6 | Primera Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA |
| Multiwell Cell Culture Plate | BD, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Cellscraper | Sarstedt, Newton |

4.5 Medien, Lösungen, Puffer

| Medien, Lösungen, Puffer: | Zusammensetzung |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADS Puffer | Aqua dest. 6,78 g/l NaCL 4,76 g/l HEPES 8 ml/l Na ₂ HPO ₄ (0,71g in 50 ml A. dest.) 1 g/l Glukose 0,4 g/l KCL 8 ml/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O (1,23g in 50 ml A.dest.) |
| Enzym-Mix | ADS Puffer 0,6 mg/l Pankreatin 0,5 mg/l Collagenase |
| DMEM-Hungermedium (DMEM-Nährmedium + FKS (10% [v/v])) | Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM) + Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; + Pyruvat; Penicillin-Streptomycin (20 U/ml Pen. G; 20 µg/ml) Gentamycinsulfat (0,08 mg/ml) |
| F 10 Medium | F 10 Medium (Ham+Glutamin) Horse Serum (10% [v/v]) Penicillin/Streptomycin (1% [v/v]) FKS (5% [v/v]) |
| Elektrophoresepuffer | Ampuwa 144 mg/ml Glycin 30,3 mg/ml Tris 10 mg/ml SDS |
| Ladepuffer | 0,75ml Ampuwa 5 ml 50% Glycerol 1,25 g 10% SDS 2,5 ml 0,625 M Tris pH 7,6 125 µl/ml 1 M DTT (+ Bromphenolblau) |
| 5xTransferpuffer | Ampuwa 29 g/l Tris 145 g/l Glycin 5 g/l SDS |
| 1xTransferpuffer | 200 ml 5xTransferpuffer 600 ml Ampuwa 200 ml Methanol |
| PBS (10x) | Aqua dest. 80 g/l NaCL 2 g/l KCL 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ 2,4g/l KH ₂ PO ₄ |
| Lysepuffer | 15ml Aqua dest 5ml Tris 20ml 10% SDS 10ml Glycerol |
| Grundstock (Zur Messung von Ca²⁺-Strömen) | NaCl 130 mM, KCL 5 mM, MgCL ₂ 1 mM, HEPES 10 mM, Pyruvat 2 mM, Ascorbinsäure 0.3 mM, Glukose 10 mM, CaCl ₂ 8 mM |

4.6 Chemikalien und sonstige Reagenzien

| Chemikalien und sonstige Reagenzien: | Hersteller |
|------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Acrylamid Electrophoresis Purity Reagent | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Ammoniumpersulfat | SERVA Electrophoresis, Heidelberg |
| Aprotinin | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Chloroform | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| DC-Protein-Assay-Reagent-A / B | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Dimethyl Sulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| di-Natriumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| di-8-ANEPPS | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS) | VWR International, Darmstadt |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Essigsäure | Merck, Darmstadt |
| F 10 Medium | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| Fetales Kälberserum (FKS) | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| Formalin | VWR International, Darmstadt |
| Gentamycinsulfat | Merck, Darmstadt |
| Glukose | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Glycerol | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Glycin | VWR International, Darmstadt |
| HEPES | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Horse Serum | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| Indo-1 | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Kaliumphosphat | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Leupeptin | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Methanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumfluorid | Merck, Darmstadt |
| Neonatal Calf Serum (NCS) | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| Nilblau (Pulver) | Merck, Darmstadt |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| Phenylmethansulfonylfluorid | Sigma-Aldrich Chemie, München |

| Chemikalien und sonstige Reagenzien: | Hersteller |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Tris-hydroxymethyl-aminomethan | VWR International, Darmstadt |
| Trypanblaulösung | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Trypsin-EDTA | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| Tween 20 | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Xylazin (Rompun) | Bayer, Leverkusen |
| α -Amylase | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Xylol | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Perjodsäure, 1,0%ig | Morphisto Evolutions, Frankfurt am Main |
| Schiff'sche Reagenz | Morphisto Evolutions, Frankfurt am Main |
| Hämatoxin, sauer nach Mayer | Morphisto Evolutions, Frankfurt am Main |
| Entellan | Merck KGaA, Darmstadt |
| Diastase (α -Amylase) | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat 10% | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Ponceau-S-Lösung | SERVA Electrophoresis, Heidelberg |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Tyramide | PerkinElmer Life Sciences, USA |
| Streptavidin-TRITC | Dianova, Germany |
| mouseanti- α -sarcomeric actin | Sigma-Aldrich, Germany |
| DAPI | Calbiochem, Germany |
| Fluorescent mounting medium | Vectashield, Burlingame, CA |

4.7 Auswertungs- und Statistikprogramme

Unter Windows 7 wurden alle Auswertungs- und Statistikprogramme ausgeführt. Zur Statistikerhebung und Diagrammgestaltung wurde Microsoft Excel 2003 und Graph Pad Prism 5.0 genutzt. Daneben wurden spezielle Programme wie UVP Labworks zur Densitometrie der Western Blot Analysen, Lucia G 4.60 zur Aufnahme und Auswertung der histologischen Schnitte und IONWIZRD von IONOptix zur Messung von Ca^{2+} -Transienten herangezogen.

Die erhobenen Daten wurden als Mittelwert \pm SEM ausgedrückt und die Gruppen mit standardmäßiger Verteilung getestet. Angewendet wurden T-Test, Mann-Whitney-U-tests und One-way ANOVA. Post-hoc Analysen wurden mit Bonferroni's Multiple Comparison Test durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied wurde ab $p < 0,05$ postuliert.

5 Methoden

5.1 Humane Vorhofproben

Myokardproben des linken Vorhofs von Patienten mit Sinusrhythmus (SR) oder Vorhofflimmern (VHF), bei denen eine Mitralklappenoperation erfolgte, wurden bezüglich bestimmter demographischer Daten, Echokardiographie, kardialer Risikofaktoren und Medikation gepaart (siehe 5.1.1). VHF wurde anhand typischer EKG-Veränderungen über mehr als 3 Monate diagnostiziert. Die letzten 12 Stunden vor Operation nahmen die Patienten keine Medikamente mehr ein. Nach Entnahme der Proben durch die Herz-Thorax-Chirurgie, wurden diese umgehend bei -80 °C eingefroren. Die Studie der humanen Myokardproben wurde durch das Ethikkomitee der Ärztekammer des Saarlandes (Nr. 131/100) genehmigt.

5.1.1 Patientencharakteristika

| | SR (8) | VHF (16) | p-Wert |
|---------------------------------|-------------|-------------|--------|
| Geschlecht (%) | 4 (50%) | 11 (68,75%) | 0,38 |
| Alter (Jahre) | 66,9 ± 4,6 | 71,4 ± 3,2 | 0,42 |
| Größe (cm) | 172,0 ± 2,7 | 174,7 ± 1,5 | 0,41 |
| Gewicht (kg) | 77,4 ± 3,6 | 79,9 ± 3,3 | 0,67 |
| Echokardiographie: | | | |
| LA (mm) | 54,0 ± 1,7 | 54,4 ± 1,7 | 0,87 |
| LVEF (%) | 58,5 ± 4,7 | 57,3 ± 5,0 | 0,88 |
| LVESd (mm) | 43,0 ± 1,8 | 39,8 ± 1,9 | 0,30 |
| LVEDd (mm) | 58,3 ± 2,0 | 56,0 ± 1,8 | 0,46 |
| FS (%) | 26,8 ± 1,7 | 29,1 ± 1,5 | 0,41 |
| IVSd (mm) | 11,3 ± 0,5 | 12,6 ± 0,5 | 0,14 |
| LVPWd(mm) | 11,7 ± 0,6 | 14,6 ± 2,8 | 0,70 |
| Kardiale Risikofaktoren: | | | |
| Hypertonie | 7 (88%) | 13 (81%) | 0,71 |
| Rauchen | 0 (0%) | 6 (38%) | 0,05 |
| Diabetes | 1 (13%) | 2 (13%) | 1,00 |
| familiäre Disp. für KHK | 0 (0%) | 2 (19%) | 0,20 |
| Hyperlipidämie | 2 (25%) | 5 (31%) | 0,76 |

| Medikation: | | | |
|---------------------------------|---------|-----------|------|
| ACE-Hemmer/ AT1-Blocker | 7 (88%) | 10 (63%) | 0,21 |
| Beta-blocker | 6 (75%) | 13 (81 %) | 0,73 |
| Ca ²⁺ -Kanal Blocker | 1 (13%) | 3 (19%) | 0,71 |
| Diuretika | 6 (75%) | 13 (81%) | 0,73 |
| Zentrale Sympatholytika | 0 (0%) | 1 (6%) | 0,48 |
| Nitrate | 0 (0%) | 1 (6%) | 0,48 |
| Digitalis | 0 (0%) | 2 (19%) | 0,20 |
| Amiodaron | 0 (0%) | 0 (0%) | 1,00 |
| Statine | 2 (25%) | 0 (0%) | 0,80 |

5.1.2 Proteinextraktion

Gewebestücke wurden mit jeweils 300 µl Lysepuffer (siehe 4.5) durch Pottern homogenisiert. Die homogenisierten Proben wurden für 4 min. bei 95 °C erhitzt und dann bei 4000 U/m für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei –20 °C eingefroren.

5.1.3 PAS- Diastase- Färbung

Durch PAS-Färbung können besonders kohlenhydrathaltige Bestandteile wie z.B. Glykogen mit Hilfe von Perjodsäure und Schiff-Reagens angefärbt werden. Die Diastase ist eine Amylase und löst Glykogen aus den Zellen. Um das Ausmaß der Glykogenvorräte in den Kardiomyozyten zu bestimmen, wurden vergleichbare Schnitte einmal einfach nach PAS gefärbt (ohne die Schritte 8 und 9 aus Liste 5.1.3) und einmal mit Diastase zwischenbehandelt und gefärbt (mit Schritt 8 und 9 aus Liste 5.1.3). Damit die Ergebnisse vergleichbar waren, wurden jeweils direkt hintereinander geschnittene Präparate gegeneinander gefärbt und ausgewertet. Damit die Proben Stabilität und eine gleichmäßige Konsistenz erhielten, wurde das Gewebe, nachdem es in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert wurde, in Paraffinwachs getränkt und in kleine Blöcke eingebettet. Dadurch war es möglich, dünne und gleichmäßige Schnitte herzustellen. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden ca. 6 µm dicke Schnitte der Gewebeproben angefertigt. Der jeweilige Schnitt wurde mit einem angefeuchteten Pinsel von der Klinge abgehoben und in ein Warmwasserbad übertragen. Hierdurch wurde der Schnitt von Faltenbildung befreit.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen. Zur Trocknung und besseren Haftung wurden die Objektträger in einem 37 °C warmem Brutschrank aufbewahrt. Nach dem Schneiden und Trocknen im Brutschrank wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert, durch die absteigende Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt und schließlich gefärbt.

Färbeprotokoll PAS-Diastase-Färbung:

| Nr. | Lösung | Dauer | Vorgang | Bemerkung |
|------------|----------------------------|--------------|------------------|---------------------|
| 1 | Xylol | 10 min. | Entparaffinieren | unter Abzug |
| 2 | Xylol | 10 min. | Entparaffinieren | unter Abzug |
| 3 | Ethanol 96%, vergällt | 5 min. | Wässern | |
| 4 | Ethanol 80%, vergällt | 5 min. | Wässern | |
| 5 | Ethanol 70%, vergällt | 5 min. | Wässern | |
| 6 | Ethanol 60%, vergällt | 5 min. | Wässern | |
| 7 | Aqua dest | 2 min. | Wässern | |
| 8 | Diastase, 0,5%ig | 20 min. | Glykogen lösen | In Aqua dest gelöst |
| 9 | Aqua nondest | 5 min. | Spülen | fließendes Wasser |
| 10 | Perjodsäure, 1,0%ig | 15 min. | Oxidieren | cave: Abfall |
| 11 | Aqua nondest | 10 min. | Spülen | fließendes Wasser |
| 12 | Aqua dest | 2 min. | Spülen | |
| 13 | Aqua dest | 2 min. | Spülen | |
| 14 | Schiff'sche Reagenz | 20 min. | Färben | |
| 15 | Aqua nondest | 5 min. | Spülen | fließendes Wasser |
| 16 | Aqua dest | 10 sec | Spülen | |
| 17 | Hämatoxilin, sauer (Mayer) | 6 min. | Gegenfärben | |
| 18 | Aqua nondest | 10 min. | Blauen | fließendes Wasser |
| 19 | Ethanol 96%, vergällt | 3 min. | Entwässern | |
| 20 | Ethanol 96%, vergällt | 3 min. | Entwässern | |
| 21 | Isopropanol | 5 min. | Entwässern | |
| 22 | Xylol | 10 min. | Entwässern | |
| 23 | Xylol | 10 min. | Entwässern | |
| 24 | Entellan | - - - | Eindecken | |

5.1.4 Immunhistologie

Um ADRP nachzuweisen wurden 3 µm dicke Paraffinschnitte von vorher in Formalin fixierten Proben für 1 Stunde bei 98 °C in einen Färbetrog mit 0,05 % „Citraconc Anhydride Solution“ (pH 7,4) gegeben und über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Schnitte wurden danach für 1 Stunde bei 37 °C mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Mit Anti-Maus-ADRP wurden die Schnitte immungefärbt. Als Sekundärantikörper wurden Peroxidase konjugierte Anti-Maus IgG benutzt. Um das Antigen zu identifizieren wurde die „Tyramide-Amplifikation-Method“ benutzt und die Proben wurden mit Streptavidin-TRITC inkubiert.

5.2 Isolation und Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten

Die Tierexperimente wurden durch das Ethikkomitee der Universität des Saarlandes genehmigt und gemäß internationaler Richtlinien “Guide of the Care and Use of Laboratory Animals”, publiziert vom “National Institutes of Health” (NIH Pub. No. 85-23, revised 1996), durchgeführt. Die “Sprague Dawley Rats” (Charles River) wurden unter Standardbedingungen im Institut für experimentelle Chirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes gehalten. Die Tierversuchsgenehmigung wurde durch das Veterinäramt und die Kreispolizeibehörde des Saar-Pfalz-Kreises erteilt. Die Isolationen wurden zwischen dem 3. und 5. Tag post partum durchgeführt. Zu Beginn wurden alle benötigten Lösungen und Puffer nach Protokoll (siehe 4.5) angesetzt, darunter ADS-Puffer, Enzym-Mix und Nährmedium. Der Kopf der Ratten wurde mit einer Schere abgetrennt und der Körper kurz mit 70 %igem Ethanol gespült. Der Thorax wurde mit einer Schere durch einen nach Kaudal gerichteten Längsschnitt eröffnet. Durch vorsichtigen Druck auf den Thorax erschien das Herz in der oberen Thoraxaperatur und wurde durch Abtrennen der Gefäßverbindungen aus dem Thorax gelöst. In einer zuvor bereitgestellten und mit ADS-Puffer gefüllten Schale (100 x 20 mm) wurden die Herzen aufbewahrt und noch vorhandene Gefäßstümpfe, Vorhöfe und perikardiales Gewebe durch vorsichtige Präparation entfernt. In einer weiteren mit ADS-Puffer gefüllten Schale wurde das Ventrikelpräparat mit einem Cutter in ca. 15 gleich große Stücke zerteilt.

Der ADS-Puffer wurde vorsichtig abpipettiert und die Gewebesuspension, unter mehrmaligem Resuspendieren mit 10 ml Enzym-Mix, in eine sterile Flasche überführt. In dieser wurde das Gewebelysat 5 min. in einem Schüttelwasserbad mit 80 – 100 U/min. bei 37 °C inkubiert. Der erste Überstand (Verdau) wurde mit einer kleinen Pipette, ohne Mitnahme von Gewebe, entnommen und verworfen. Nach erneuter Zugabe von 10 ml Enzym-Mix wurde die Suspension für 20 min. im Schüttelwasserbad inkubiert. Der Überstand wurde in einen sterilen 50 ml Falcon pipettiert und die Enzymaktivität mit 2 ml Neonatal Calf Serum (NCS) abgestoppt. Das durch Zentrifugation des Falcons für 5 min. bei 700 U/min. entstandene Pellet wurde, nach Entfernung des Überstandes, in 4 ml NCS, durch vorsichtiges Schütteln gelöst. Der Falcon wurde im Brutschrank inkubiert. Diese Prozedur wurde fünf weitere Male durchgeführt, wobei sich die Schüttelzeiten wie folgt änderten: 25 min.; 25 min.; 15 min.; 10 min.; 10 min.; 5 min.. Nach der letzten Zentrifugation wurden in einem neuen Falcon alle Zellsuspensionen gesammelt und durch erneute Zentrifugation ein Pellet gebildet, von Überstand befreit und diesmal in 7 ml Medium gelöst. Die Lösung wurde in einen neuen Falcon filtriert, wobei der Filter vor und nach Filtration jeweils mit 1 ml Medium gespült wurde. Diese 9 ml Zellsuspension wurden auf drei 6 cm Schalen verteilt und für 60 min. bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach vorsichtigem auftippen der Schalen wurde unter dem Mikroskop das Ausmaß der Fibroblastenadhäsion kontrolliert. Aus jeder Schale wurde das Medium in einen gemeinsamen 50 ml Falcon pipettiert. Jede der drei Schalen wurde mit 2 ml Medium gewaschen und das Medium jeweils wieder in den 50 ml Falcon gegeben, so dass am Ende 15 ml Medium mit den darin gelösten neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRVMs) in einem Falcon gesammelt waren. Als nächstes wurden die Kardiomyozyten in den 15 ml ausgezählt, hierzu wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblaulösung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, vier große Eckquadrate (Volumen je Eckquadrat: 0,1 µl) ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Gesamtzahl der Kardiomyozyten ergab sich Folgendermaßen: $MW \times 2 \times 10^4 \times 15$ (Volumen der Zellsuspension). Die ausgerechnete Menge wurde durch 0,6 geteilt und so die Anzahl der zu füllenden Wells ermittelt. Durch Zugabe von Medium konnten wir die 15 ml Zellsuspension auf das gewünschte Volumen von 2 ml pro Well verdünnen. Diese 2 ml waren nötig um eine ausreichende Eindringtiefe der Elektroden und damit eine adäquate Stimulation

zu gewährleisten. Die Zellen wurden mit $1,6 - 1,8 \times 10^6$ Zellen pro Well in Sechswell-Zellkulturplatten ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 48 h inkubiert. Nach 48 h Inkubation begannen die Zellen spontan zu oszillieren. Die Zellen wurden, nachdem das Medium gewechselt wurde, für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde alle 48 h ein Mediumwechsel durchgeführt.

5.3 Elektrische Stimulation neonataler Rattenkardiomyozyten

Um zu überprüfen, ob elektrische Impulse von Kardiomyozyten in adäquate Kontraktionen umgesetzt werden können, wurden Kardiomyozyten im Rahmen eines Pilotexperiments stimuliert. Nachdem die Kardiomyozyten 4 Tage nach Isolation spontan zu kontrahieren begannen, wurden sie mittels Feldstimulation normofrequent und tachykard stimuliert. Durch optische Kontrolle unter dem Mikroskop konnte die Umsetzung der von uns vorgegebenen Frequenzen in mechanische Kontraktionen der Zellen sichergestellt werden. Die Kardiomyozyten konnten mit einer Frequenz von bis zu 4 Hz, einer Stimulationsdauer von 5 ms und einer Feldstärke von $7,5 \text{ mv/cm}^2$ stimuliert werden (Abb. 5 A). Bei höheren Frequenzen, längerer Stimulationsdauer oder größerer Feldstärke konnte nicht jeder Impuls in eine Kontraktion umgesetzt werden.⁸¹

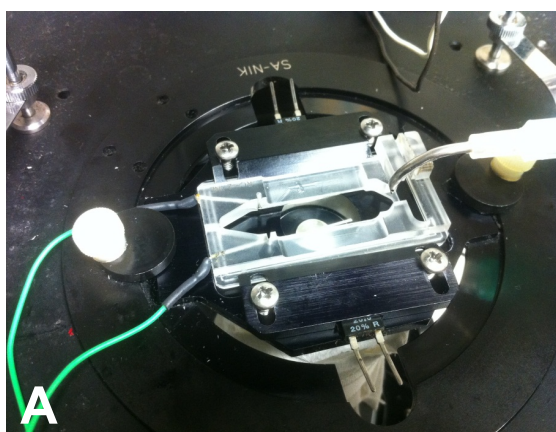


Abb. 5: Pilotexperiment und Zellkulturmodell. Stimulation einzelner Kardiomyozyten (A) und Zellkulturstimulationsgerät (Ion Optix Cell Culture EP Stimulator) zur regulären und irregulären Stimulation mehrerer Kardiomyozyten in Sechswell-Zellkulturplatten (B).

Mit dem „multichannel cell stimulator“ (Ion Optix Cell Culture EP Stimulator) war es möglich, die Pulsdauer (ms), die Frequenz (Hz) und die Spannung (V) individuell einzustellen (Abb. 5 B). Mittels Feldstimulation konnten mehrere Zellen parallel in verschiedenen Sechswell-Zellkulturplatten bei unterschiedlichen Frequenzen stimuliert werden. Darüber hinaus konnten die Kardiomyozyten sowohl regulär als auch irregulär stimuliert werden. Bei regulärer und irregulärer Stimulation konnte über die gesamte Stimulationszeit die gleiche Anzahl von Impulsen und damit Kontraktionen sichergestellt werden. Bei irregulärer Stimulation wurde von einem pseudo-randomisierten Programm, bei der jeweiligen Frequenz, mit 50 % Abweichung die gleiche Impulszahl wie bei regulärer Stimulation garantiert. Beispiel: bei einer Frequenz von 1 Hz mit 50 % Abweichung wurden 100 Pulse in 100 sec abgegeben, die Periode zwischen zwei Impulsen konnte jedoch zwischen 500 und 1500 ms liegen (Abb. 6).

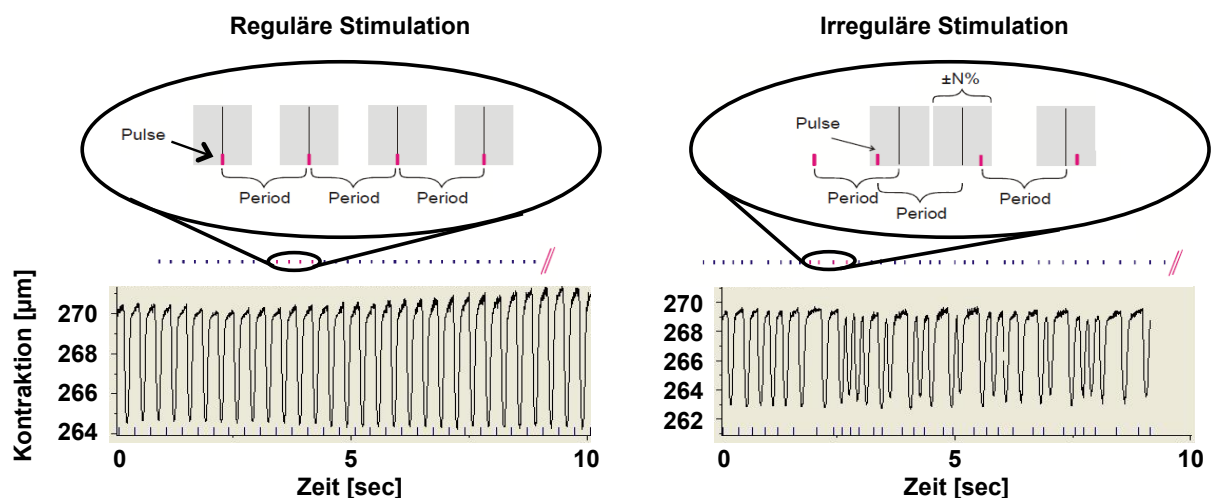


Abb. 6: Illustration der regulären und irregulären Stimulation, exemplarische Kontraktionsanalyse und Impulsfolge. Mit dem beschriebenen Zellkulturstimulationsgerät war es möglich bei regulärer und irregulärer Stimulation über die gesamte Stimulationszeit die gleiche Anzahl von Impulsen und Kontraktionen sicherzustellen.

Eine regelhafte Kontraktion der einzelnen Zellen wurde zu Beginn und am Ende jedes Stimulationszyklus unter dem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung kontrolliert. Für reproduzierbare Ergebnisse setzten wir unter visueller Kontrolle eine Kontraktion von mindestens 80 % der Myozyten voraus.

Um die Bildung toxischer Elektrophoreseprodukte zu minimieren, wechselte die Polarität nach jeder Einzelstimulation. 4 Tage nach Isolation wurde bei ausreichend spontaner Kontraktion der Myokardzellen mit der Stimulation begonnen. Das Setup wurde wie in Abb. 7 beschrieben gewählt.

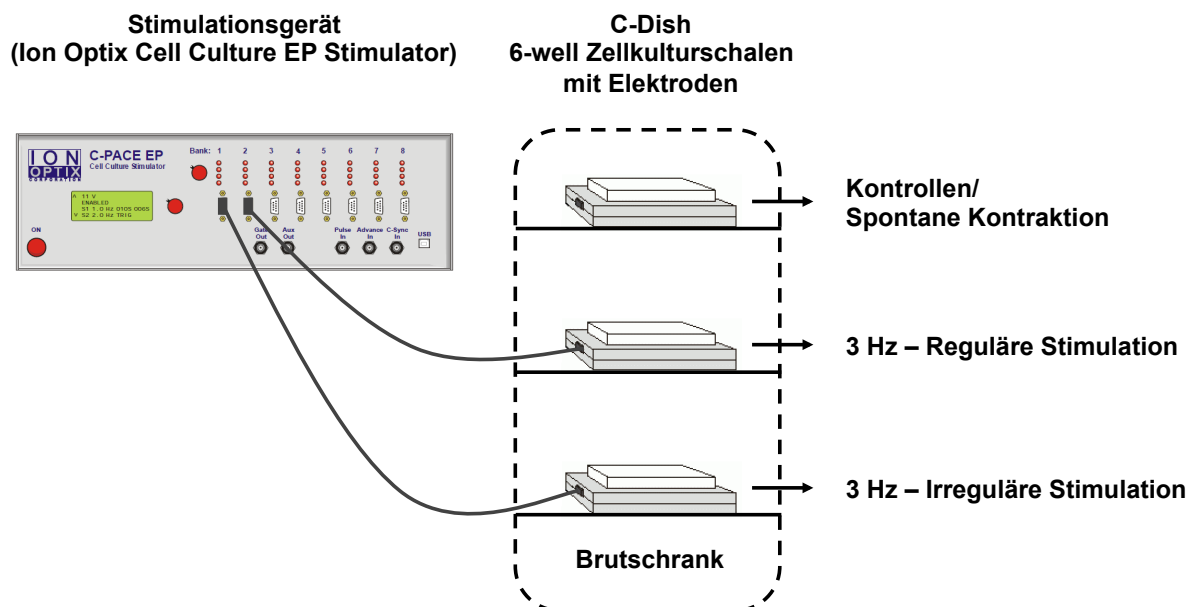


Abb. 7: Versuchsaufbau des Zellkulturmodells. Zellkulturstimulationsgerät mit Leitungen, Elektroden und Sechs-Well-Zellkulturschalen bei den drei Bedingungen: spontane Kontraktion/Kontrolle, 3 Hz reguläre und 3 Hz irreguläre Stimulation.

Die Sechs-Well-Zellkulturschalen wurden über den gesamten Zeitraum weiterhin bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank aufbewahrt und auch dort stimuliert. Lediglich zur visuellen Kontrolle wurden sie für kurze Zeit aus dem Brutschrank entnommen. Die Reinigung der Platinelektroden erfolgte nach jedem Gebrauch zuerst mechanisch und dann in destilliertem Wasser für mindestens 48 h. Eine Desinfektion unmittelbar vor der Verwendung erfolgte mit 70 %igem Ethanol für 1 h.

5.4 Spezielle Proteinverarbeitung

5.4.1 Isolation und Proteinextraktion neonataler Rattenkardiomyozyten

Nach der Stimulation wurde das Medium abpipettiert, jeweils bei den Kontrollen und den passenden regulär und irregulär stimulierten Zellen parallel. Die Zellen wurden mit 100 µl Lysepuffer pro Well geerntet. Dabei wurden sie mit einem Cellscraper vom Boden der einzelnen Wells mobilisiert und in 2 ml Eppendorfgefäße pipettiert. Das Zelllysate wurde für 4 min. bei 96 °C erhitzt und nach kurzer Zentrifugation bei -20 °C eingefroren.

5.4.2 Membran/Cytosol Auftrennung

Um nach Proteinextraktion (siehe 5.4.1) die Zellmembran aus dem Gesamtprotein zu isolieren, wurde das Lysat in gekühlte Ultrazentrifugatröhrchen übertragen, 1:1 mit 1 mM KCL versetzt und für 10 min. inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C und 45.000 U/min. für 2 h ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Zentrifugat mit 100 µl Lysepuffer resuspendiert und beides bei -20 °C eingefroren. Der Überstand entsprach dem Cytosol und das Zentrifugat den Zellmembranen.

5.4.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung des Gesamtlysats aus Zellkultur und Gewebstücken erfolgte nach der Methode von Lowry et al., eine der Biuret-Methode verwandten, kalorimetrischen Methode⁸². Dabei wurde zu Beginn 1 µl des zu untersuchenden Proteinlysats 1:20 mit Ampuwa verdünnt. Durch Zugabe von 100 µl DC-Protein-Assay-Reagent-A wurde ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet. Dieser Komplex wurde anschließend durch Zugabe von 800 µl DC-Protein-Assay-Reagent-B reduziert. Während der Inkubationszeit von 15 min. bei Raumtemperatur färbte sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bläulich.

Die Extinktion der Lösung wurde bei 540 nm photometrisch gemessen, um dann die daraus resultierende Proteinkonzentration zu berechnen. Als Standardproteinlösung diente Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100 – 1.000 µg/ml. Bei jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

5.5 Western Blot Analyse

Durch Western Blot Analysen wurden Proteine der Zellen aus Kulturen oder aus Gewebestücken der Größe nach aufgetrennt. Durch monoklonale Antikörper gegen ein spezifisches Protein und durch Peroxidase- oder Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper wurden diese sichtbar und quantifizierbar gemacht. Dabei ist die Intensität proportional zum Gehalt des jeweiligen Proteins im Lysat.

5.5.1 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels Gelelektrophorese in 10 %igen oder 12 %igen Polyacrylamid-SDS Gelen (siehe unten). Ein SDS-Gel bestand aus einem Trenn- und einem Sammelgel. In einer Minigelkammer wurde das Trenngel gegossen. Um eine gerade Gelfront zu gewährleisten, wurde das Trenngel mit Aquadest überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde das Wasser abgeschüttet, das Sammelgel gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Jeweils 50 µg des Gesamtllysats wurden mit entsprechender Menge 5x-Ladepuffer versetzt. Für das Aufbrechen der für die Tertiärstruktur wichtigen Disulfidbrücken wurde als Redoxmittel Dithiothreitol (DTT) zugesetzt. Um ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis herzustellen, wurden die Proteine mit dem ebenfalls im Ladepuffer enthaltenen anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat belegt. Die nun linearisierten Proteine wurden auf das Gel geladen und in Anwesenheit eines Elektrophoresepuffers bei einer konstanten Spannung von 30 mA aufgetrennt. Nach durchschnittlich 150 min. hatte die Laufront das Ende der Glasplatte erreicht.

Polyacrylamid-SDS-Gele (10 %ig oder 12 %ig)

| Substanz | Trenngel | | Sammelgel |
|-----------------------|----------|----------|-----------|
| | 10 %ig | 12 %ig | |
| Ampuwa | 4,0 ml | 3,3 ml | 1,4 ml |
| 30% Acrylamide Mix | 3,3 ml | 4,0 ml | 0,33 ml |
| 1,0 M Tris (pH 6,8) | - - - | - - - | 0,25 ml |
| 1,5 M Tris (pH 8,8) | 2,5 ml | 2,5 ml | - - - |
| 10% SDS | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,02 ml |
| 10% Ammoniumpersulfat | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,02 ml |
| TEMED | 0,004 ml | 0,004 ml | 0,002 ml |

5.5.2 Protein-Transfer

Bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA und mit Hilfe eines Transferpuffers und Filtern erfolgte durch ein Tank-Blot System die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran. Für die gesamte Dauer von 120 min. wurde das gesamte System durch Eiswürfel und Kühlakku gekühlt. Nach dem Transfer wurden die Membranen für 60 min. in 5 %iger Trockenmilch und unter langsamem Schütteln auf einem Schüttel- und Mischgerät im Kühlraum bei 4 °C geblockt.

5.5.3 Antikörperinkubation

Die Nitrozellulose-Membranen wurden mit dem jeweiligen Primärantikörper (Verdünnung siehe Liste 4.1.1) in 1 %iger Milch für 12 h bei 4 °C auf einem Schüttel- und Mischgerät inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörperfragmente wurden nach folgendem Schema abgewaschen:

- 2x 5 min. mit 1xPBS-Tween
- 2x 10 min. mit 1xPBS-Tween
- 2x 2 min. mit 1xPBS

Die Membranen wurden mit einem peroxidasekonjugiertem Sekundärantikörper (Verdünnung und Inkubationsdauer siehe Liste 4.1.2) in 5 %iger Milch bei Raumtemperatur ebenfalls auf einem Schüttel-Mischgerät inkubiert. Die ungebundenen Fragmente wurden erneut wie oben beschrieben mit 1xPBS-Tween und 1xPBS abgewaschen. Die an Proteinbanden gebundenen Fragmente wurden mit einem ECL-Kit (enhanced chemiluminescence) auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht und densitometrisch quantifiziert.

5.5.4 GAPDH als Ladekontrolle

Als Ladekontrolle sämtlicher Western-Blot Analysen wurde (wenn nicht anders angegeben) das Referenzgen Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Dadurch konnte eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Gelkammern sichergestellt bzw. die Signalstärke der Banden normiert werden. Alle Ergebnisse wurden auf die GAPDH standardisiert.

5.5.5 Phosphorylierungsstellen wichtiger Proteine

Durch Phosphorylierung kann die Aktivität verschiedener Proteine und Signaltransduktionsprozesse beeinflusst werden. Für den Nachweis der Phosphorylierung der jeweiligen Proteine wurden Antikörper gegen einzelne Phosphorylierungsstellen auf der Polypeptidkette eingesetzt. Die getesteten Phosphorylierungsstellen werden im Ergebnisteil jeweils genauer angegeben.

5.6 Quantifizierung der Aufnahme von Glukose und Fettsäuren

Sowohl Glukose als auch Fettsäuren sind wichtige Nährstoffe, die dem Herzen zur Energiegewinnung dienen. Die zelluläre Aufnahme dieser Stoffe bei unterschiedlichen Bedingungen wurde durch radioaktiv markierte Substanzen quantifiziert. Die Aufnahme der markierten Stoffe ins Cytosol erfolgt entweder durch

Diffusion oder über spezielle Transporter. Die aufgenommenen Substanzen werden dann entweder gespeichert oder direkt metabolisiert. Da das Isotop der markierten Stoffe ebenfalls in die Zelle aufgenommen wird und dort verbleibt, kann man dessen abgegebene Strahlung detektieren und so eine quantitative Aussage über die Aufnahme der markierten Stoffe tätigen.

5.6.1 Aktivitätsmessung der Proben

Die Kardiomyozyten wurden zunächst wie oben beschrieben isoliert, kultiviert und für 12 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in 2 ml F 10 Medium stimuliert. Danach wurden die Zellen für weitere 30 min. ebenfalls bei 37 °C und 5 % CO₂, mit ³H-Glukose oder ¹⁴C-Palmitoyl-Säure inkubiert. Um die Glukoseaufnahme zu quantifizieren, wurden die Zellen mit 3 µl/Well ³H-Glukose, was einer Konzentration von 1µCi/1µl entsprach, inkubiert. Die 3 µl ³H-Glukose wurden zu den 2 ml F 10 Medium pipettiert. Für die Bestimmung der Aufnahme von Fettsäuren wurden die Zellen mit 5 µl/Well ¹⁴C-Palmitoyl-Säure, was einer Konzentration von 0,2 µCi/1µl entsprach, inkubiert. Auch hier wurde die ¹⁴C-Palmitoyl-Säure direkt zu den 2 ml F 10 Medium gegeben. Nach Ablauf der 30minütigen Inkubation wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit kaltem autoklaviertem 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden mit jeweils 200 µl kaltem Lysepuffer aus den Wells gelöst und in Szintillationsröhrchen überführt. In jedes Röhrchen wurden 750 µl Szintillationscocktail gegeben. Die Emissionen wurden in einem Szintillationscounter gemessen und die Aufnahme der jeweiligen Substanz prozentual als Anteil von den spontan kontrahierenden Zellen ausgedrückt.

5.7 Messungen von transmembranösen Ca²⁺-Strömen

Die Kardiomyozyten wurden wie oben beschrieben bei 37 °C stimuliert (siehe 5.3). Um die Ca²⁺-Konzentration zu erheben wurden die Zellen über 20 min. mit Indo-1 (1 µmol/l) bei 25 °C inkubiert. Der Grundstock wurde bei 37 °C auf pH 7.4 eingestellt. Der Ca²⁺-Transient wurde mit IONWIZARD Software von IONOptix analysiert. Die Daten wurden gesammelt und mit GraphPad statistisch analysiert^{83,84}.

5.8 Photometrische Messungen von Aktionspotentialen

Das optische System zur Messung der Aktionspotentiale (APs) basierte auf einem invertierten Mikroskop. Bei der Benutzung von di-8-ANEPPS stellte ein Monochromator die eingestrahlte Wellenlänge (460 ± 7 nm) bereit, die von einem dichroitischen Spiegel (zentriert auf 485 nm) reflektiert wurde und durch ein Immersionsobjektiv (20x0,75) zu den mit Farbstoff beladenen Zellen weitergeleitet wurde. Die abgestrahlte Fluoreszenz wurde initial durch einen 532 nm dichroitischen Filter (DCLP) gereinigt und auf zwei Kanäle (580 DCLP) aufgeteilt. Durch zwei Avalanche-Photodioden wurde das Licht erfasst. Die Signale wurden mit dem DSI bei 1 kHz digitalisiert und aufgenommen.

Die Kardiomyozyten wurden mit di-8-ANEPPS, wie von Kaestner et al beschrieben⁸⁵, mit einer Konzentration von 5 μ M für 7 und 10 min. gefärbt. Dann wurden die Zellen mit einer Tyrode-Lösung der gleichen Konzentration wie der Testkonzentration gewaschen. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen mit 1 Hz stimuliert. Verschiedene leuchtende Areale wurden durch eine rechteckige Vorrichtung von den übrigen Zellen abgegrenzt. Für die Messungen wurden zufällig ausgewählte kontrahierende Zellen benutzt. Die photometrischen Daten wurden mit Igor Pro Software analysiert und die AP-Dauer bei 30 % und 70 % Repolarisation errechnet (APD_{30} und APD_{70}).

6 Ergebnisse: Humanes Vorhofmyokard

6.1 Expression und Phosphorylierung der Calmodulin-Kinase-II und AMP-aktivierten Proteinkinase sind bei Vorhofflimmern gesteigert

Welche metabolischen Veränderungen werden durch Vorhofflimmern (VHF) in Kardiomyozyten verursacht und wie wird der Lipid- und Glukosestoffwechsel dadurch beeinflusst? Zu Beginn wurden die Calmodulin Kinase II (CaMKII) und die α_2 -Untereinheit der AMP-aktivierten Proteinkinase (α_2 -AMPK) auf mögliche Änderungen hin untersucht. Western Blot Analysen des linksatrialen humanen Myokards zeigten bezüglich der CaMKII (H-300) bei Patienten mit Vorhofflimmern (VHF) im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus (SR) eine Steigerung sowohl der Expression auf $156 \pm 19\%$ ($n=8$ für SR; $n=12$ für VHF; $*p < 0,05$) (Abb. 8 A) als auch der Phosphorylierung (Phosphorylierungsstelle Thr286) auf $153 \pm 21\%$ ($n=8$ für SR; $n=12$ für VHF; $*p < 0,05$) (Abb. 8 B). Ebenfalls zeigten Western Blot Analysen bei Patienten mit VHF gegenüber SR eine Zunahme der Expression der α_2 -AMPK auf $194 \pm 19\%$ ($n=8$ für SR; $n=12$ für VHF; $**p < 0,01$) (Abb. 8 C) und eine gesteigerte Phosphorylierung der AMPK (Phosphorylierungsstelle Thr172) auf $128 \pm 8\%$ ($n=8$ für SR; $n=12$ für VHF; $*p < 0,05$) (Abb. 8 D). Diese Ergebnisse zeigten erste Hinweise auf einen veränderten Stoffwechsel von Kardiomyozyten bei VHF und bildeten die Grundlage für genauere Analysen des Lipid- und Glukosestoffwechsels.

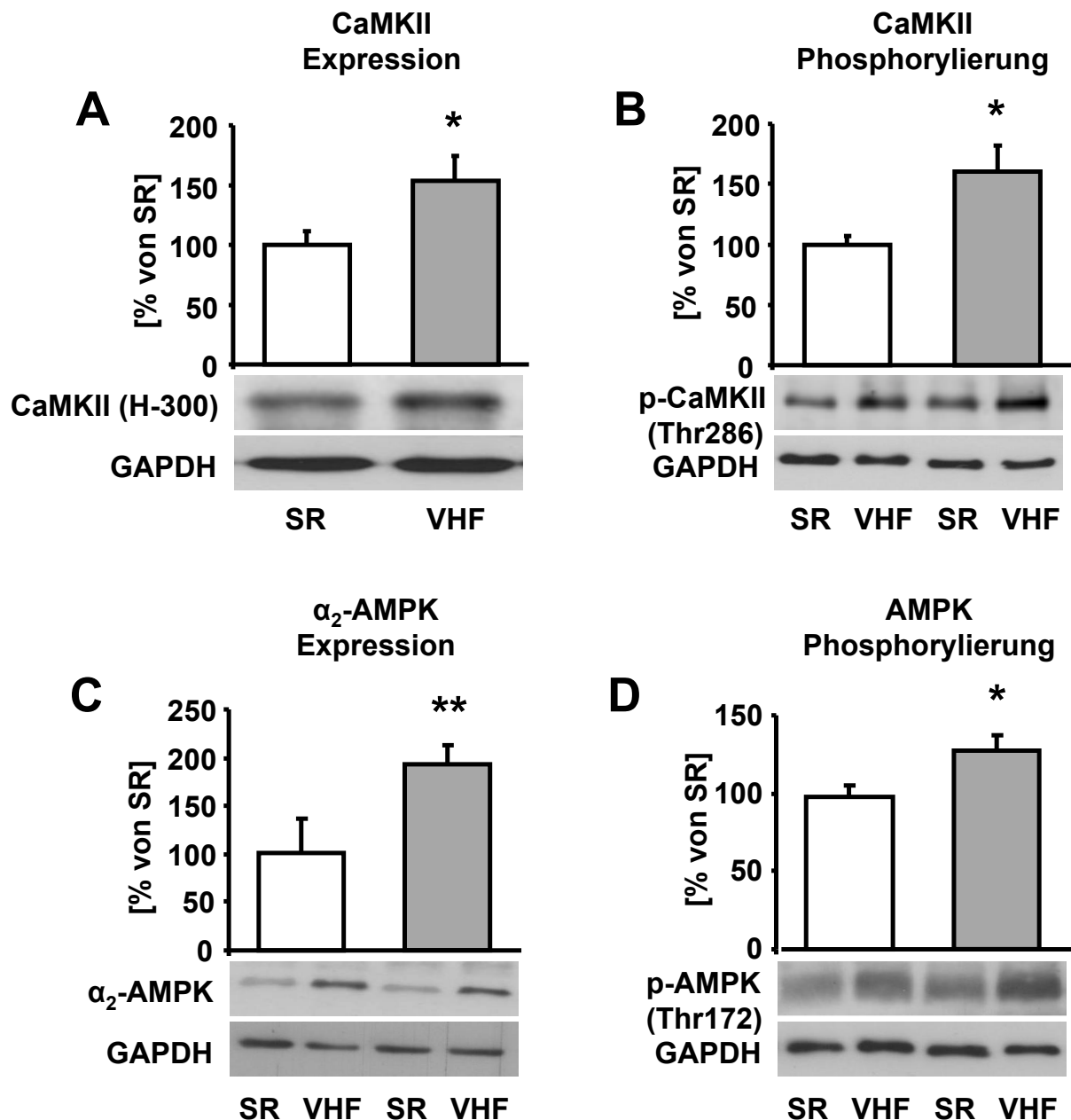


Abb. 8: Gesteigerte Expression und Phosphorylierung der Calmodulin Kinase II und der α₂-AMP-aktivierten Proteinkinase in humanem linksatrialem Myokard bei Vorhofflimmern. Repräsentative Western-Blots und Quantifizierung der Expression (A) und Phosphorylierung (Phosphorylierungsstelle Thr286) (B) der CaMKII sowie der Expression der α₂-AMPK (C) und Phosphorylierung (Phosphorylierungsstelle Thr172) (D) der AMPK bei Patienten mit VHF im Vergleich mit Patienten mit SR (jeweils n=8 für SR □ ; n=12 für VHF ■; *p < 0,05 ; **p< 0,01); (jeweils auf die GAPDH standardisiert).

6.2 Myokardialer Fettsäuremetabolismus bei Vorhofflimmern

6.2.1 Gesteigerte Membran/Cytosol Translokation der Fettsäuretranslokase CD36 bei Vorhofflimmern

Hat die Aktivierung der α_2 -AMPK bei VHF Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel? Kardiomyozyten decken durch die Oxidation von Fettsäuren physiologischerweise 60-90 % ihres Bedarfs an ATP. Die Fettsäuretranslokase (CD36) leistet den größten Anteil an der Aufnahme von Fettsäuren in Kardiomyozyten und ist ein zentrales Zielenzym der α_2 -AMPK. Bei Patienten mit VHF zeigten Western-Blot Analysen von humanem linksatrialem Myokard ein gesteigertes Membran/Cytosol Verhältnis von CD36 auf $238 \pm 47\%$ ($n=6$ für SR; $n=8$ für VHF; $*p < 0,05$) (Abb. 9). Dies deutet auf eine gesteigerte Aufnahme von Fettsäuren bei VHF hin.

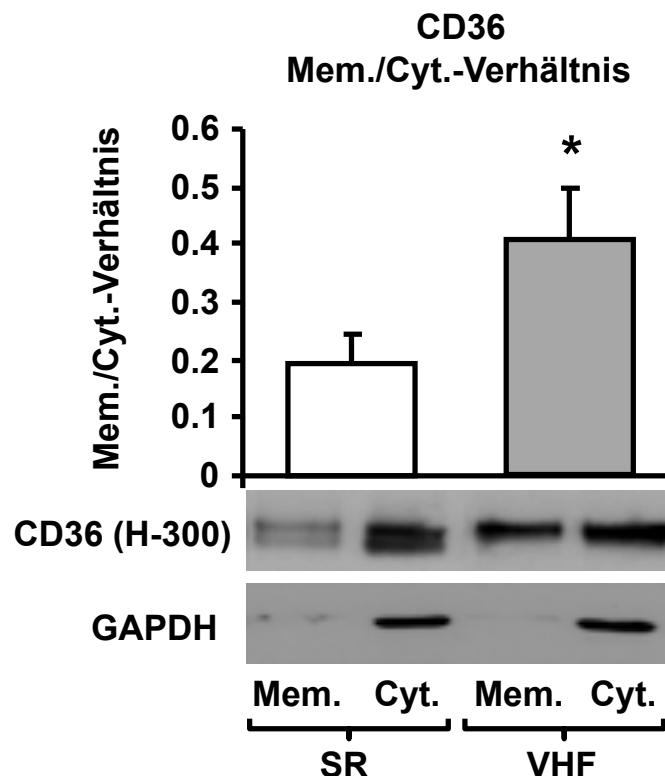


Abb. 9: Gesteigertes Membran/Cytosol Verhältnis der Fettsäuretranslokase CD36 in humanem linksatrialem Myokard bei Vorhofflimmern. Repräsentative Western-Blots und Quantifizierung des Membran/Cytosol Verhältnisses der Fettsäuretranslokase CD36 (H-300) bei Patienten mit VHF gegenüber SR ($n=6$ für SR □ ; $n=8$ für VHF ■ ; $*p < 0,05$; auf GAPDH standardisiert).

6.2.2 Reduzierte Phosphorylierung der Acetyl-CoA Carboxylase bei Vorhofflimmern

Wie werden die aufgenommenen Fettsäuren von den Kardiomyozyten verarbeitet? Ein wichtiges Schlüsselenzym der Fettsäurebiosynthese ist die Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), ein weiteres Zielenzym der α_2 -AMPK. Die Phosphorylierung der ACC (Phosphorylierungsstelle Ser79), war in Gewebeproben von Patienten mit VHF im Vergleich zu Patienten mit SR auf $68 \pm 11\%$ ($n=8$ für SR; $n=16$ für VHF; $**p < 0,01$) reduziert (Abb. 10). Der Abbau von Fettsäuren war also trotz gesteigerter Aufnahme reduziert.

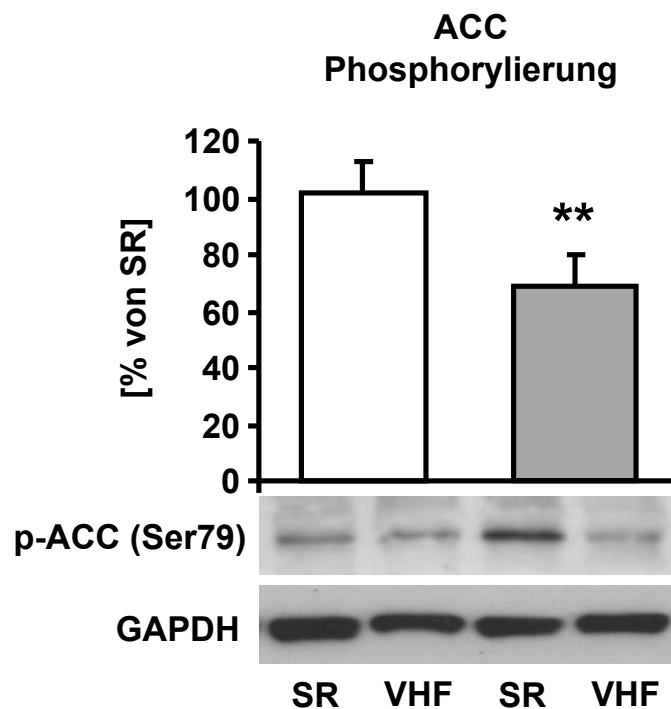
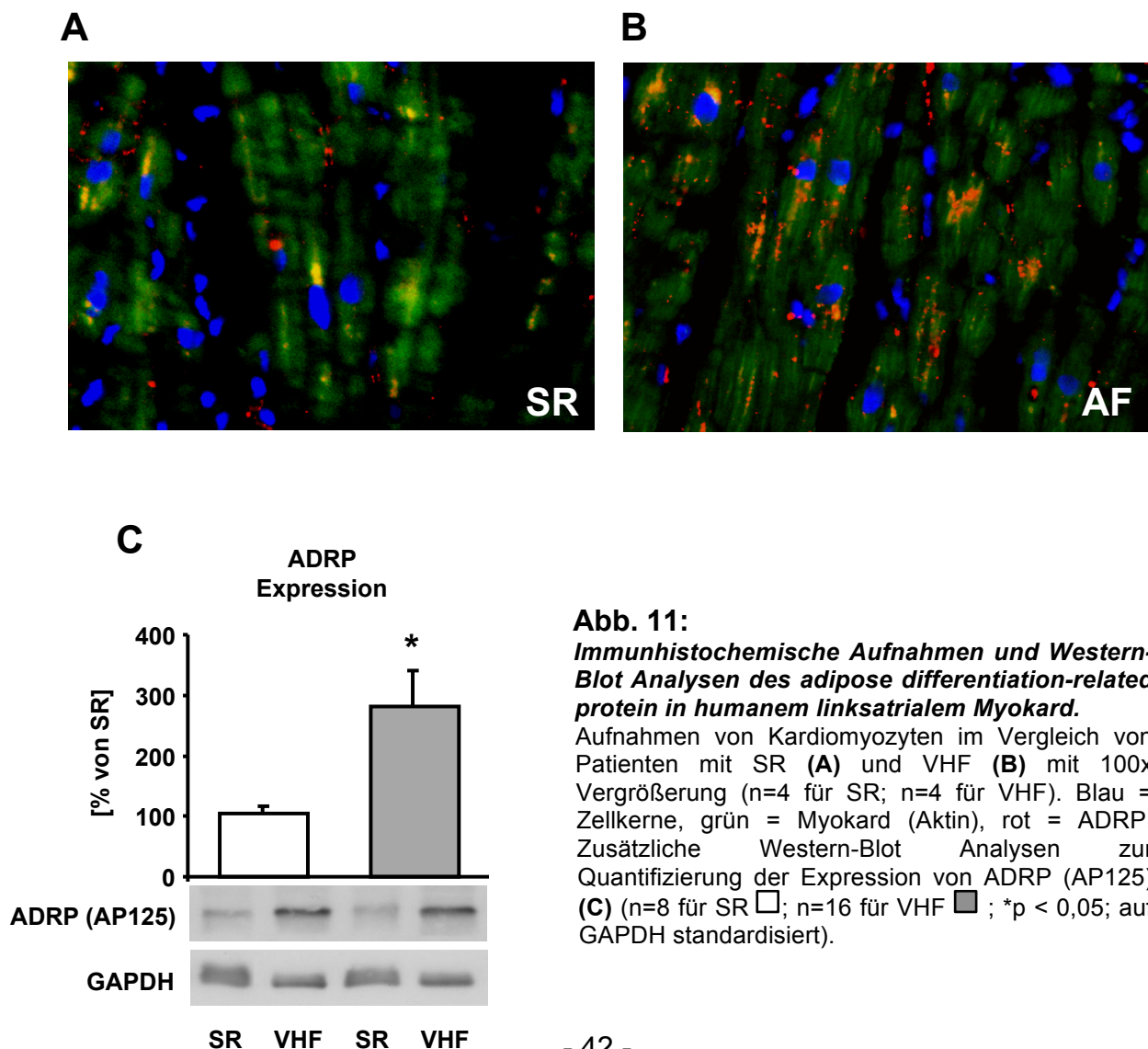


Abb. 10: Reduzierte Phosphorylierung der Acetyl-CoA Carboxylase in humanem linksatrialem Myokard bei Vorhofflimmern. Repräsentative Western-Blots und Quantifizierung der Phosphorylierung der ACC (Phosphorylierungsstelle Ser79) bei Patienten mit VHF im Vergleich zu SR ($n=8$ für SR □; $n=16$ für VHF ■; $**p < 0,01$; auf GAPDH standardisiert).

6.2.3 Immunhistochemischer Nachweis des adipose differentiation-related protein bei Vorhofflimmern

Welche Folgen hat die bei VHF verminderte Verarbeitung von Fettsäuren bei gleichzeitig gesteigerter Aufnahme auf die Kardiomyocyten? Bei Hinweisen auf gesteigerte Aufnahme und reduzierte Oxidation von Fettsäuren und damit potentieller Lipidakkumulation erfolgte immunhistochemisch der Nachweis des adipose differentiation-related protein (ADRP). Die Akkumulation von ADRP, einem sensitiven Marker für Lipidakkumulation^{51,86}, war in Gewebeproben von Patienten mit VHF erhöht (Abb. 11 A und B). Western Blot Analysen zeigten bei VHF im Vergleich zu SR eine gesteigerte Expression von ADRP (AP125) auf $281 \pm 58\%$ ($n=8$ für SR; $n=16$ für VHF; $*p < 0,05$) (Abb. 11 C). Bei VHF konnte eine gesteigerte Ablagerung von Lipiden in Kardiomyocyten gezeigt werden.



6.3 Myokardialer Glukosemetabolismus bei Vorhofflimmern

6.3.1 Reduzierte SNAP-23 Membrantranslokation und gesteigerte GLUT4 Expression bei Vorhofflimmern

Welche Auswirkungen hat die Lipidakkumulation bei VHF auf den Glukosestoffwechsel? Die Translokation des Glukosetransporters GLUT4 aus intrazellulären Vesikeln zur Zellmembran wird vorwiegend durch die Interaktion von t-SNAREs und v-SNAREs reguliert. Zu den SNARE-Proteinen zählt unter anderem das SNAP-23, das der Fusion der GLUT4 Vesikel mit der Plasmamembran dient. Das Membran/Cytosol Verhältnis von SNAP-23 (A-5) war in Proben von Patienten mit VHF auf $54 \pm 6\%$ ($n=8$ für SR; $n=12$ für VHF; $*p < 0,05$) reduziert (Abb. 12 A). Bei der Aufnahme der Glukose nach intrazellulär über den hauptsächlich regulierten Glukosetransporter GLUT4 (1F8) zeigte sich in Proben von Patienten mit VHF, verglichen mit SR, eine gesteigerte Gesamtexpression von GLUT4 auf $324 \pm 81\%$ ($n=6$ für SR; $n=6$ für VHF; $*p < 0,05$) (Abb. 12 B). Die Membran/Cytosol Translokation hingegen war bei Patienten mit VHF im Vergleich zu SR auf $64 \pm 8\%$ ($n=6$ für SR; $n=6$ für VHF; $*p < 0,05$) reduziert (Abb. 12 C).

Zusätzlich wurde der Glukosetransporter GLUT1, der vorrangig für die basale Glukoseaufnahme zuständig ist, untersucht. Hier konnte keine Änderung des Membran/Cytosol Verhältnisses beobachtet werden (jeweils $n=6$; n.s.) (Abb. 12 D).

Die α_2 -AMPK abhängige Expression von Glut4 war bei VHF gesteigert. Durch Lipidakkumulation bei VHF war das Membran/Cytosol Verhältnis von SNAP-23 vermindert, dies führte zu einer reduzierten Membrantranslokation von GLUT4.

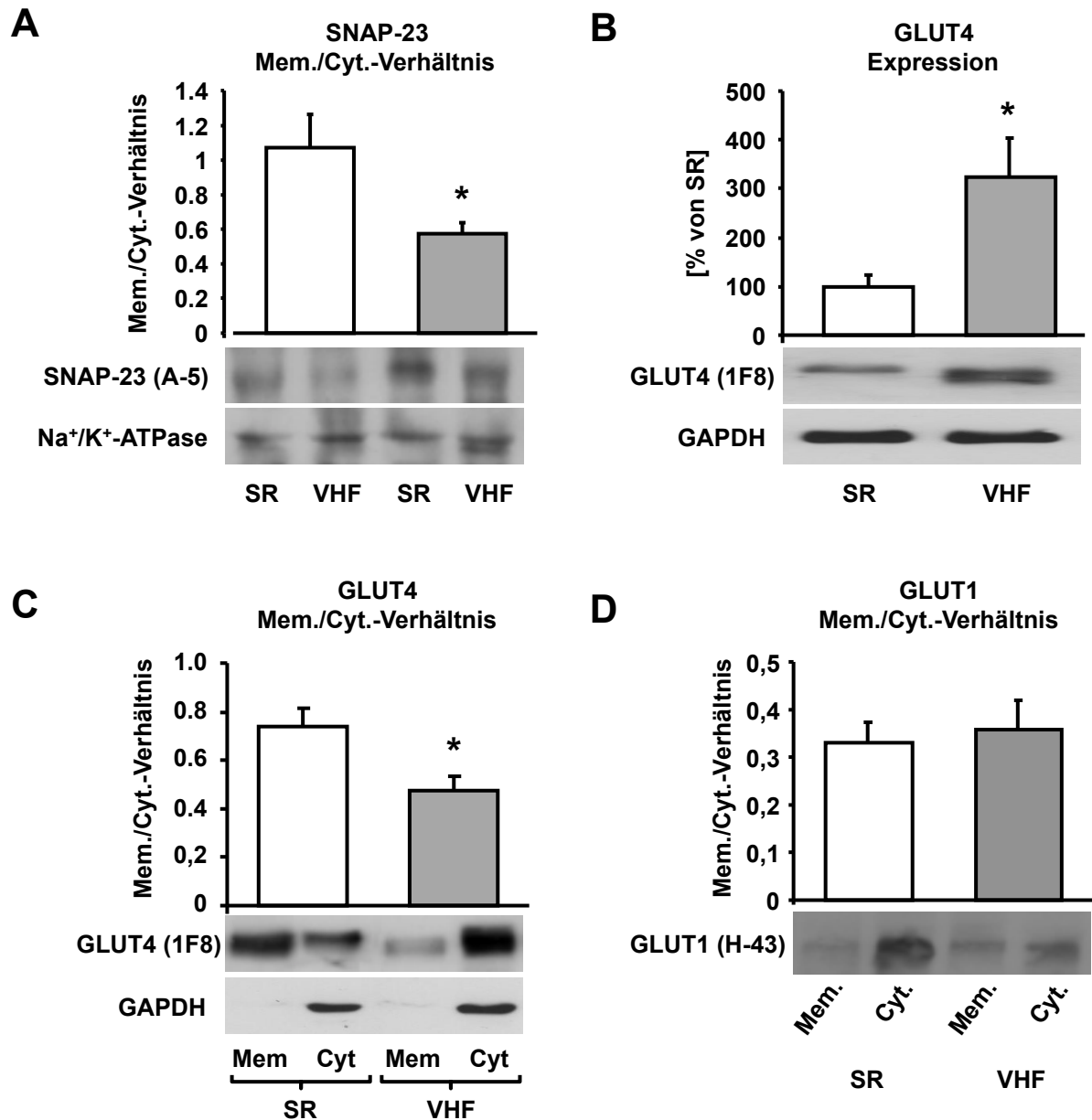


Abb. 12: Reduziertes Membran/Cytosol Verhältnis von SNAP-23 und gesteigerte Gesamtexpression des Glukosetransporters GLUT4 bei Vorhofflimmern in humanem linksatrialem Myokard. Repräsentative Western-Blots und Quantifizierung der Membrantranslokation von SNAP-23 (A-5) (n=8 für SR; n=12 für VHF; *p < 0,05; auf die Na⁺/K⁺-ATPase standardisiert) (A), der Gesamtexpression des Glukosetransporters GLUT4 (1F8) (n=6 für SR; n=6 für VHF; *p < 0,05) (B), der Membrantranslokation von GLUT4 (1F8) (n=6 für SR; n=6 für VHF; *p < 0,05) (C) und der Membran/Cytosol Translokation des Glukosetransporters GLUT1 (H-43) (n=6 für SR; n=6 für VHF; n.s.) (D) bei Patienten mit VHF ■ im Vergleich mit SR □; (GLUT1/4 jeweils auf die GAPDH standardisiert).

6.3.2 Bei Vorhofflimmern initiiert Akt durch Phosphorylierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 eine Glykogenspeicherung

Welche Veränderungen im Glukosemetabolismus treten bei VHF auf? Die Proteinkinase B (Akt) spielt unter anderem im Glukosemetabolismus, bei der Apoptose und bei der Zellproliferation eine wichtige Rolle. Die Expression von Akt war in Gewebeproben humaner Vorhöfe bei VHF im Vergleich zu SR signifikant auf $154 \pm 9\%$ ($n=6$ für SR; $n=9$ für VHF; $**p < 0,01$) gesteigert (Abb. 13 A). Die Phosphorylierung von Akt (Phosphorylierungsstelle Ser473) stieg bei VHF auf $132 \pm 13\%$ ($n=6$ für SR; $n=9$ für VHF; n.s.) an (Abb. 13 B). Akt phosphorylierte die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3; Phosphorylierungsstelle Ser21), ein wichtiges Regulatorenzym der Glykogensynthese. Durch diese Phosphorylierung wurde die GSK-3 inaktiviert und die Glykogensynthase aktiviert. Bei VHF zeigte sich im Vergleich zum SR eine gesteigerte Phosphorylierung der GSK-3 (Ser21) auf $157 \pm 16\%$ ($n=6$ für SR; $n=9$ für VHF; $*p < 0,05$) (Abb. 13 C). Die reduzierte Membrantranslokation von GLUT4 und die gesteigerte Glykogensynthese deuteten auf ein Ungleichgewicht des Glukosemetabolismus hin.

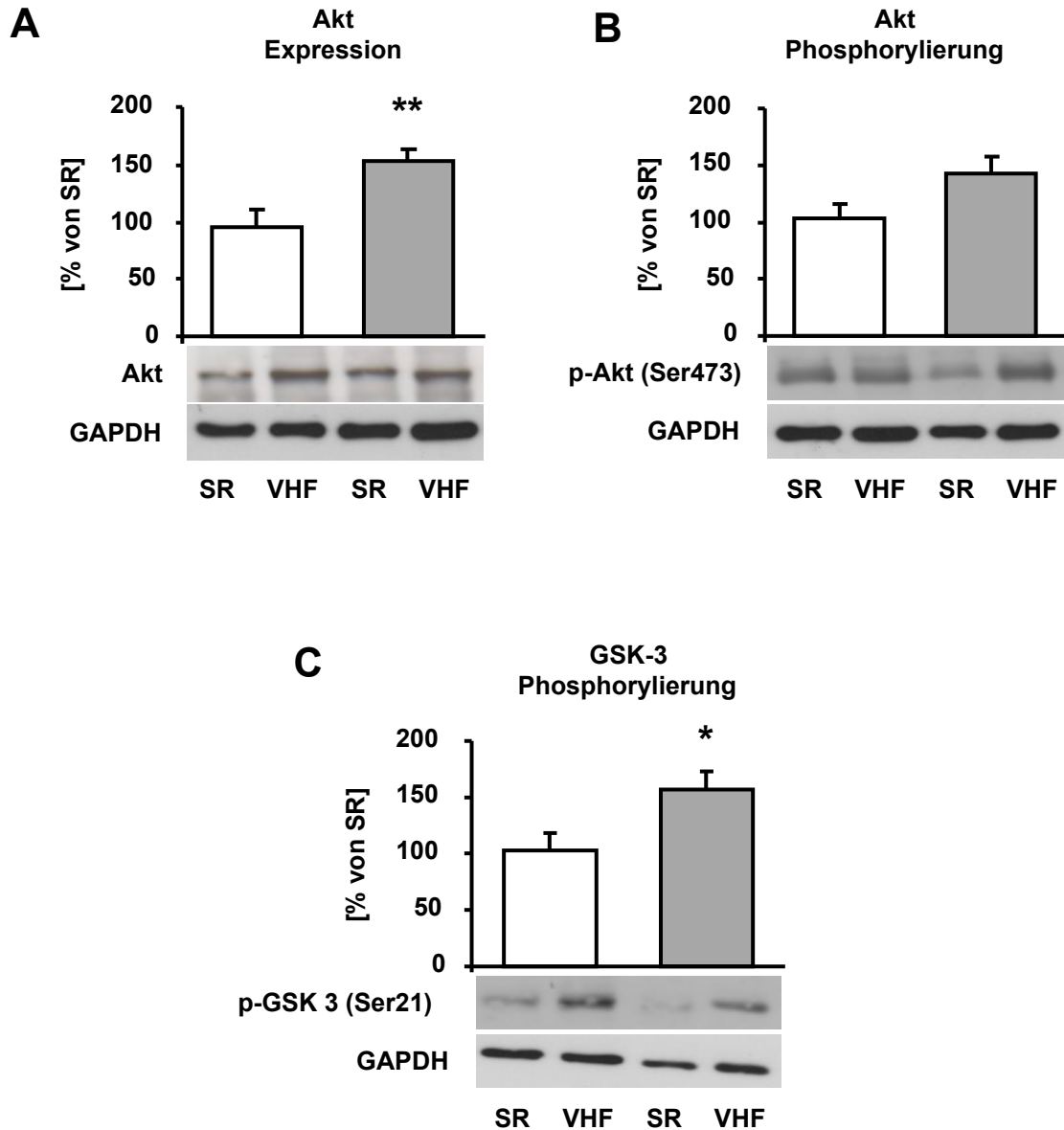
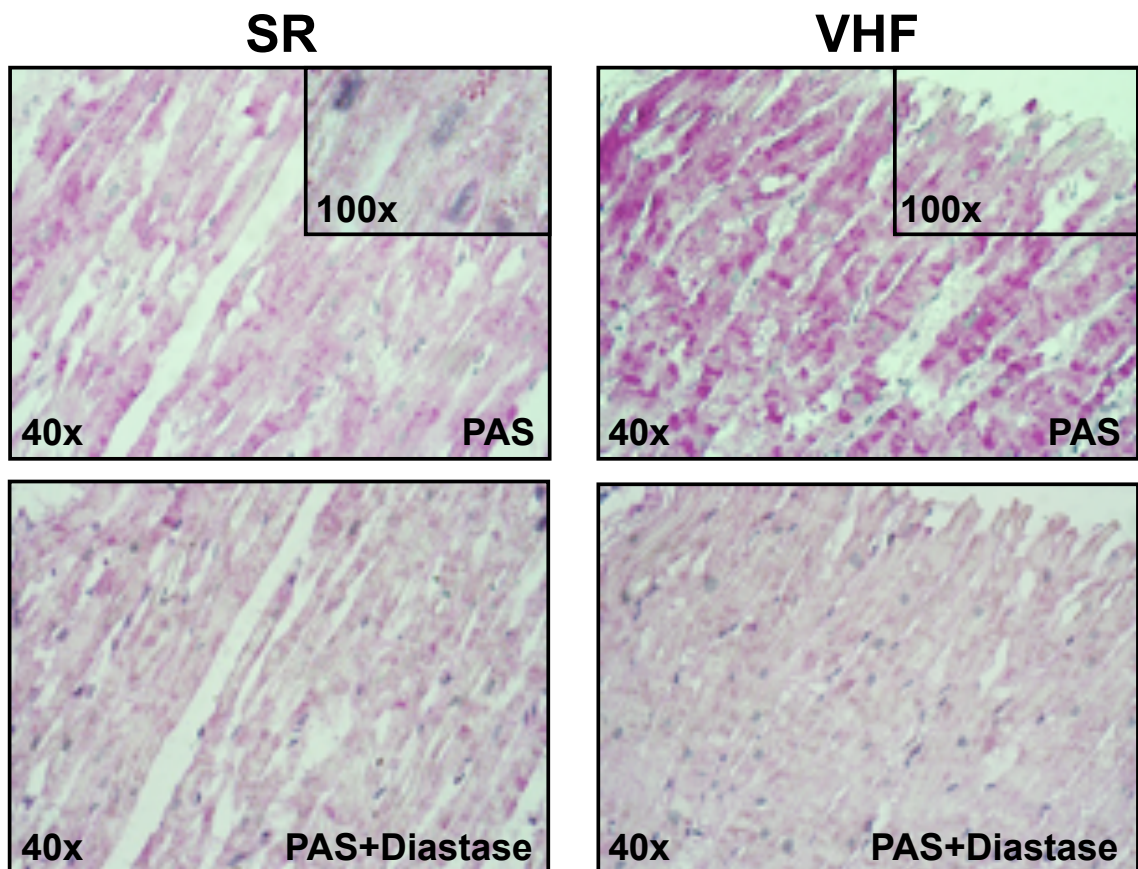


Abb. 13: Akt abhängige Phosphorylierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 in humanem linksatrialem Myokard bei Vorhofflimmern. Repräsentative Western-Blots und Quantifizierung der Expression **(A)** und Phosphorylierung **(B)** von Akt (Phosphorylierungsstelle Ser473) sowie Phosphorylierung der GSK-3 (Phosphorylierungsstelle Ser21) **(C)**, bei Patienten mit VHF im Vergleich mit SR. (jeweils n=6 für SR □; n=9 für VHF ■; *p < 0,05 ; **p < 0,01); (jeweils auf die GAPDH standardisiert).

6.3.3 Vorhofflimmern führt zu einer gesteigerten Speicherung und intrazellulären Akkumulation von Glykogen

Welche Folgen hat die gesteigerte Phosphorylierung der GSK-3 bei VHF in Kardiomyozyten? Bei VHF führte die gesteigerte Phosphorylierung der GSK-3 (Phosphorylierungsstelle Ser21) zu einer gesteigerten Akkumulation von Glykogen. Durch PAS-Diastase Färbung konnte diese Akkumulation von Glykogen bestätigt werden (auf $381 \pm 60\%$; $n=4$) (Abb. 14).

A



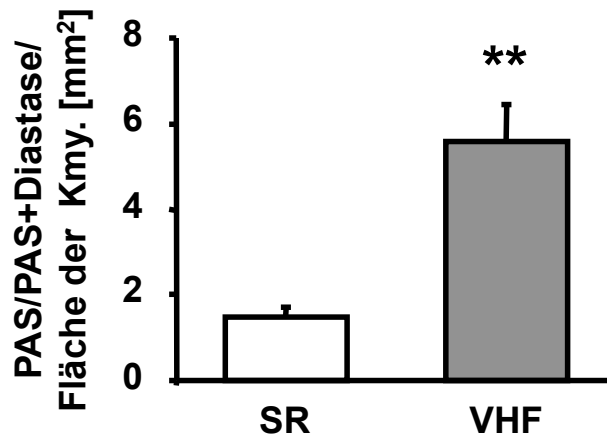
B

Abb. 14: Nachweis von Glykogen durch PAS und PAS+Diastase Färbung von humanem linksatrialem Myokard. PAS und PAS+Diastase Färbung (A) von LHO in 40-100x Vergrößerung von Patienten mit VHF und SR (n=4 für SR; n=4 für VHF). Quantifizierung (B) durch Vergleich der gefärbten Kardiomyozyten/ mm² bei 40x Vergrößerung (n=4 für SR □ ; n=4 für VHF ■ ; **p < 0,01).

6.4 Aktivierung der proapoptotischen Signalkaskade bei Vorhofflimmern

Wie wirken sich die Veränderungen im Lipid- und Glukosemetabolismus bei VHF auf den zellulären Stoffwechsel aus? Ein wichtiger Vertreter proapoptotischer Proteine ist das bcl-2-associated X Protein (bax). Bax kann einen Mitosearrest verursachen und somit eine Apoptose induzieren. Bei VHF konnte in Gewebeproben humaner Vorhöfe eine Steigerung der bax(B-9)-Expression auf 256±47% (n=6 für SR; n=10 für VHF; *p < 0,05) im Vergleich zu SR gezeigt werden (Abb. 15 A). Die Expression des b cell lymphoma 2 (bcl-2(N-19)), einem Hauptvertreter antiapoptotischer Proteine, welche eine Suppression der Apoptose induziert, änderte sich bei VHF nicht signifikant (n=6 für SR; n=10 für VHF; n.s.) (Abb. 15 C). p16 hemmt Cyclinabhängige Kinasen und verhindert damit einen Übertritt von der G1 zur S Phase des Zellzyklus. Western-Blot Analysen von Patienten mit VHF zeigten eine gesteigerte Expression von p16(F12) auf 690±19% (n=6 für SR; n=10 für VHF; **p < 0,01) im Vergleich zu SR (Abb. 15 B). Untersuchungen von p53(FL-393), einem wichtigen Regulationsenzym des Zellzyklus, welches die Aktivität vieler Gene bremst, ergab bei VHF keine signifikante Änderung gegenüber SR (n=6 für SR; n=10 für VHF; n.s.) (Abb. 15 D).

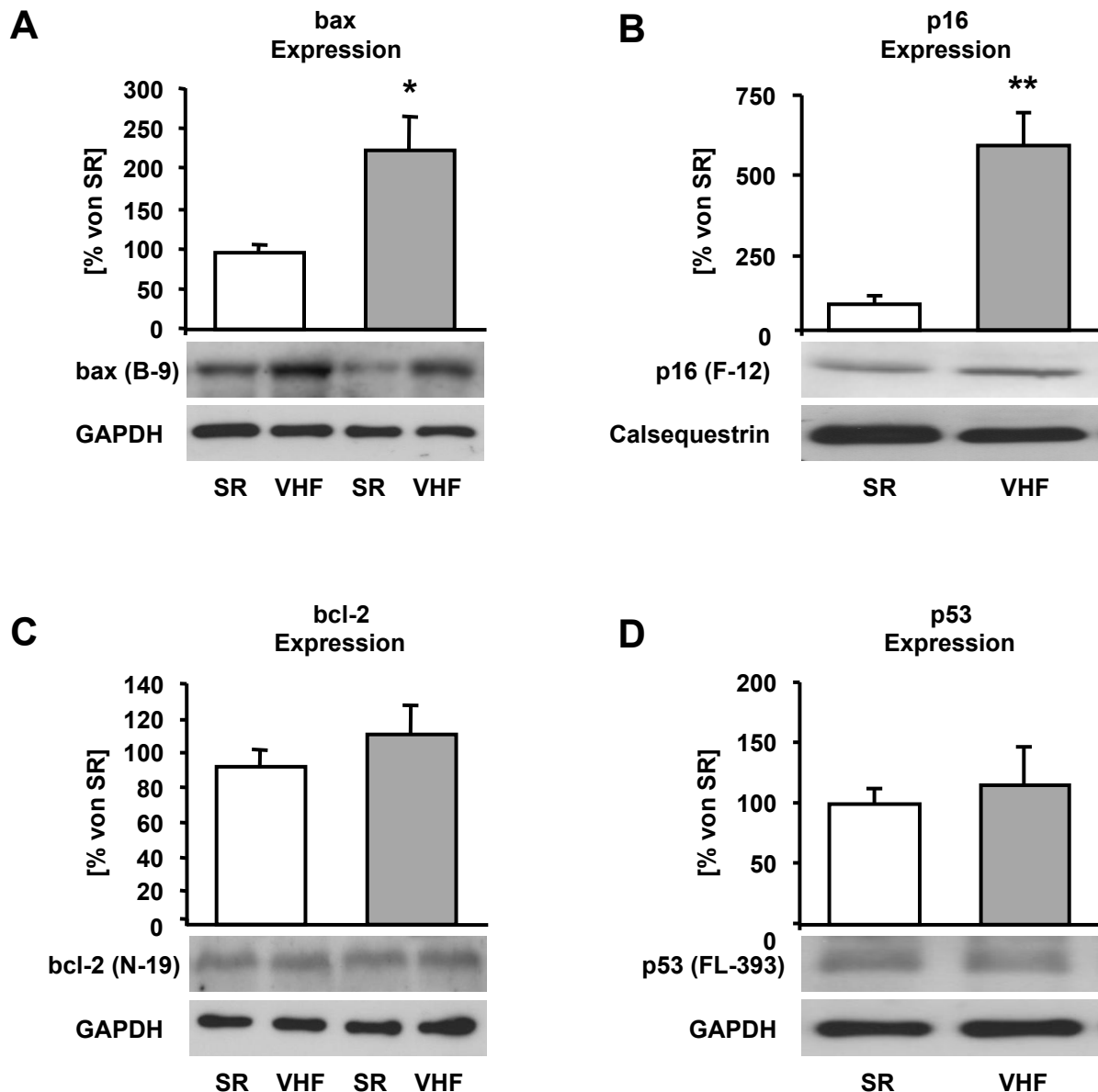


Abb. 15: Die Expression der Apoptoseparameter *bax* und *p16* war bei Vorhofflimmern in humanem linksatrialem Myokard gesteigert, *bcl-2* und *p53* blieben unverändert. Repräsentative Western-Blots und Quantifizierung zeigte eine Zunahme der Expression von *bax* (B-9) (A) und *p16* (F-12) (B) bei VHF im Vergleich zu SR. Die Expression von *bcl-2* (N-19) (C) und *p53* (FL-393) (D) blieb unbeeinflusst. (n=6 für SR □; n=10 für VHF ■; *p < 0,05 ; **p < 0,01); (*bax*, *bcl-2* und *p53* auf GAPDH, *p16* auf Calsequestrin standardisiert).

Bei VHF kam es zu charakteristischen Veränderungen im Lipid- und Glukosemetabolismus. Diese metabolischen Veränderungen führten zu einer gesteigerten Apoptose.

7 Ergebnisse: neonatale Rattenkardiomyozyten

7.1 Änderungen der Ca^{2+} -Homöostase bei neonatalen Rattenkardiomyozyten durch irreguläre Stimulation

VHF ist durch vermehrte, unregelmäßige Kontraktionen gekennzeichnet. Welchen Einfluss hat diese Arrhythmie auf den myokardialen Stoffwechsel? Und kann man diese Veränderungen in einem Zellkulturmodell unter standardisierten Bedingungen reproduzieren? VHF beeinflusst besonders den transmembranösen Ca^{2+} -Strom und die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase und ist durch einen gesteigerten diastolischen Ca^{2+} -Gehalt charakterisiert ⁸⁷. In einer Pilotstudie wurden einzelne Myozyten isoliert und separat stimuliert. Dadurch konnten erste Erfahrungen über Widerstandsfähigkeit und Stimulierbarkeit der Myozyten gesammelt werden. Impulsdauer, Feldstärke und Stimulationszeit konnten schrittweise optimiert werden. Auch zeigten sich erste, richtungsweisende Änderungen der Ca^{2+} -Homöostase. Die Ergebnisse der Pilotstudie wurden in ein Zellkulturmodell übertragen. Dadurch war es möglich eine große Anzahl an Myozyten zeitgleich und unter gleichen Bedingungen zu stimulieren. Im Zellkulturmodell wurden $\frac{2}{3}$ der isolierten Kardiomyozyten mit dem Stimulationsgerät mit einer Frequenz von 3 Hz stimuliert. Dabei wurde $\frac{1}{3}$ regulär und $\frac{1}{3}$ irregulär stimuliert. Das letzte Drittel wurde nicht stimuliert sondern kontrahierte spontan und diente als Kontrollgruppe. Die irreguläre Stimulation wurde durch eine zufallsgesteuerte Frequenzmodulation im Rahmen einer 50 prozentigen Abweichung generiert. Dadurch konnte sowohl bei irregulärer als auch bei regulärer Stimulation die gleiche Frequenz über den Versuchszeitraum sichergestellt werden. Die Impulsdauer betrug 2-3 ms. Die Feldstärke lag mit < 7 V/cm unter dem zellschädigenden Grenzwert ⁸¹. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_c$ bei regulärer und irregulärer Stimulation im Vergleich zu spontan kontrahierenden Zellen. Bei Fluoreszenzaufnahmen von Kardiomyozyten mit Indo-1 konnte ein erhöhtes diastolisches $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in irregulär stimulierten Zellen verglichen mit regulär stimulierten oder spontan kontrahierenden Zellen beobachtet werden. In den stimulierten Kardiomyozyten war das diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nach irregulärer Stimulation über 12 Stunden (Abb. 16 A und B) aber auch

schon nach nur 5 minütiger Stimulation (Abb. 16 C und D) gesteigert. In den regulär stimulierten und spontan kontrahierenden Zellen hingegen blieb das diastolische $[Ca^{2+}]_c$ unverändert. Zusammenfassend zeigten sich im Zellkulturmodell charakteristische Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase vergleichbar mit den Veränderungen bei VHF in humanen Kardiomyozyten.

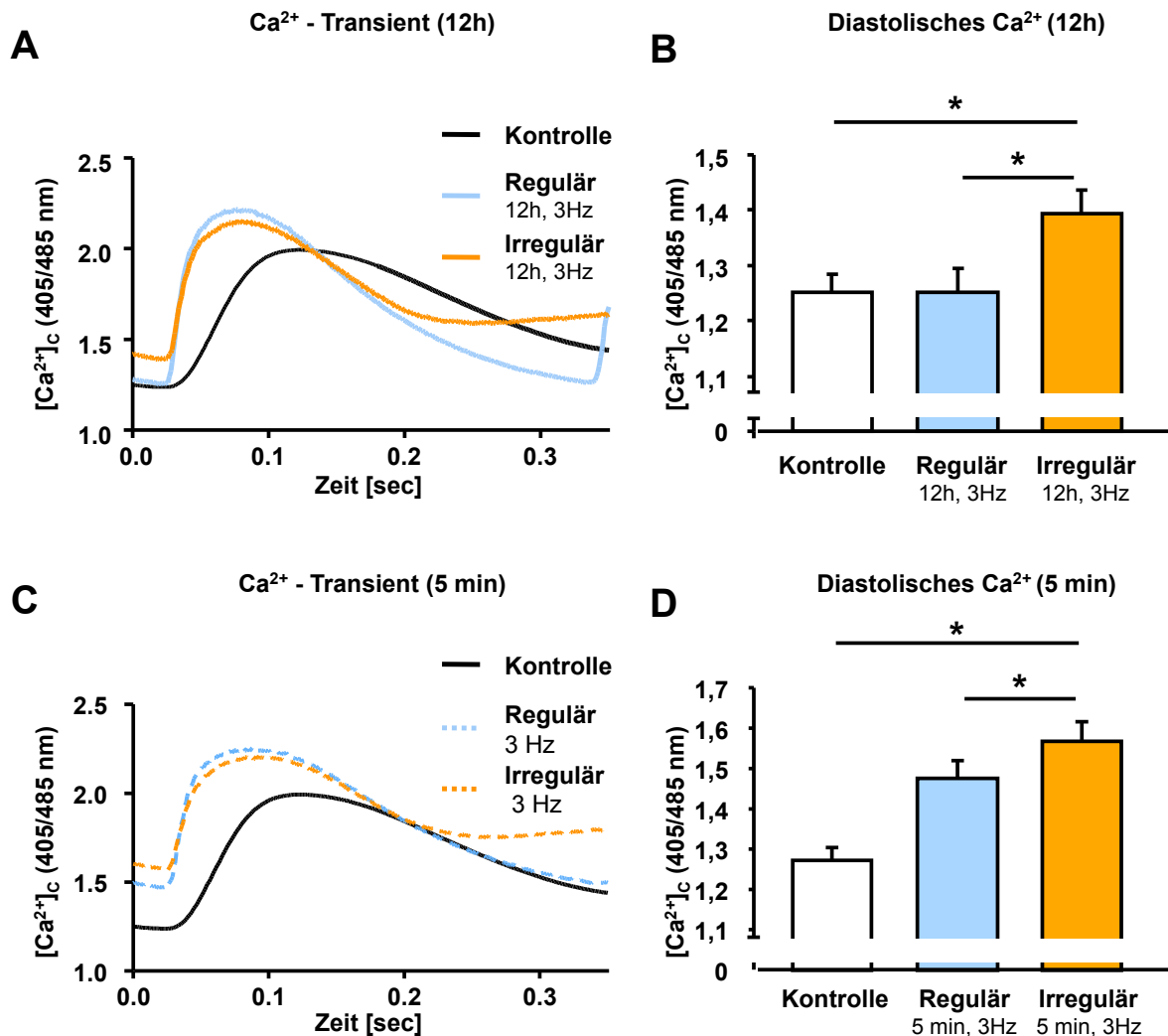


Abb. 16: Gesteigerte Ca^{2+} -Transienten und diastolischer Ca^{2+} -Gehalt in kultivierten Kardiomyozyten nach arrhythmischer Stimulation. Ca^{2+} -Transient (A) und diastolisches $[Ca^{2+}]_c$ (B) nach regulärer und irregulärer Stimulation für 12 h bei 3 Hz (n=29 für die Kontrollen; n=23 für die reguläre Stimulation; n= 29 für die irreguläre Stimulation; *p < 0,05) und Ca^{2+} -Transient (C) und diastolisches $[Ca^{2+}]_c$ (D) nach regulärer und irregulärer Stimulation für 5 min. bei 3 Hz (jeweils n=25; *p < 0,05).

7.2 Reduzierte Aktionspotentialdauer und Amplitude von Aktionspotentialen bei neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Stimulation

Sind im Zellkulturmodell auch Veränderungen im Sinne eines elektrischen Remodelings mit Änderung der Morphologie des Aktionspotentials (AP) reproduzierbar? Optische Messungen von APs nach 12 stündiger Stimulation mit einer Frequenz von 1 Hz zeigten charakteristische morphologische Änderungen. Sowohl die frühe als auch die späte Aktionspotentialdauer (APD) war reduziert. Die APD_{30} war im Vergleich zu spontan kontrahierenden Zellen auf $121 \pm 3 \text{ ms}$ vs. $159 \pm 5 \text{ ms}$ reduziert (Abb. 17 A und C), die APD_{70} war, verglichen mit den spontan kontrahierenden Kontrollen auf $249 \pm 6 \text{ ms}$ vs. $321 \pm 11 \text{ ms}$ reduziert (Abb. 17 A und D). Die reguläre und die irreguläre Stimulation haben verschiedene Effekte auf die APD_{30} und die APD_{70} . Bei irregulär stimulierten Zellen zeigte sich verglichen mit regulär stimulierten Zellen eine Abnahme der AP-Amplitude von 13 % (Abb. 17 B). Im Zellkulturmodell zeigten sich nach irregulärer Stimulation charakteristische Veränderungen der APs die mit den AP-Veränderungen bei VHF vergleichbar waren. Diese Änderungen waren bei gleicher Stimulationsfrequenz und Stimulationsdauer reproduzierbar.

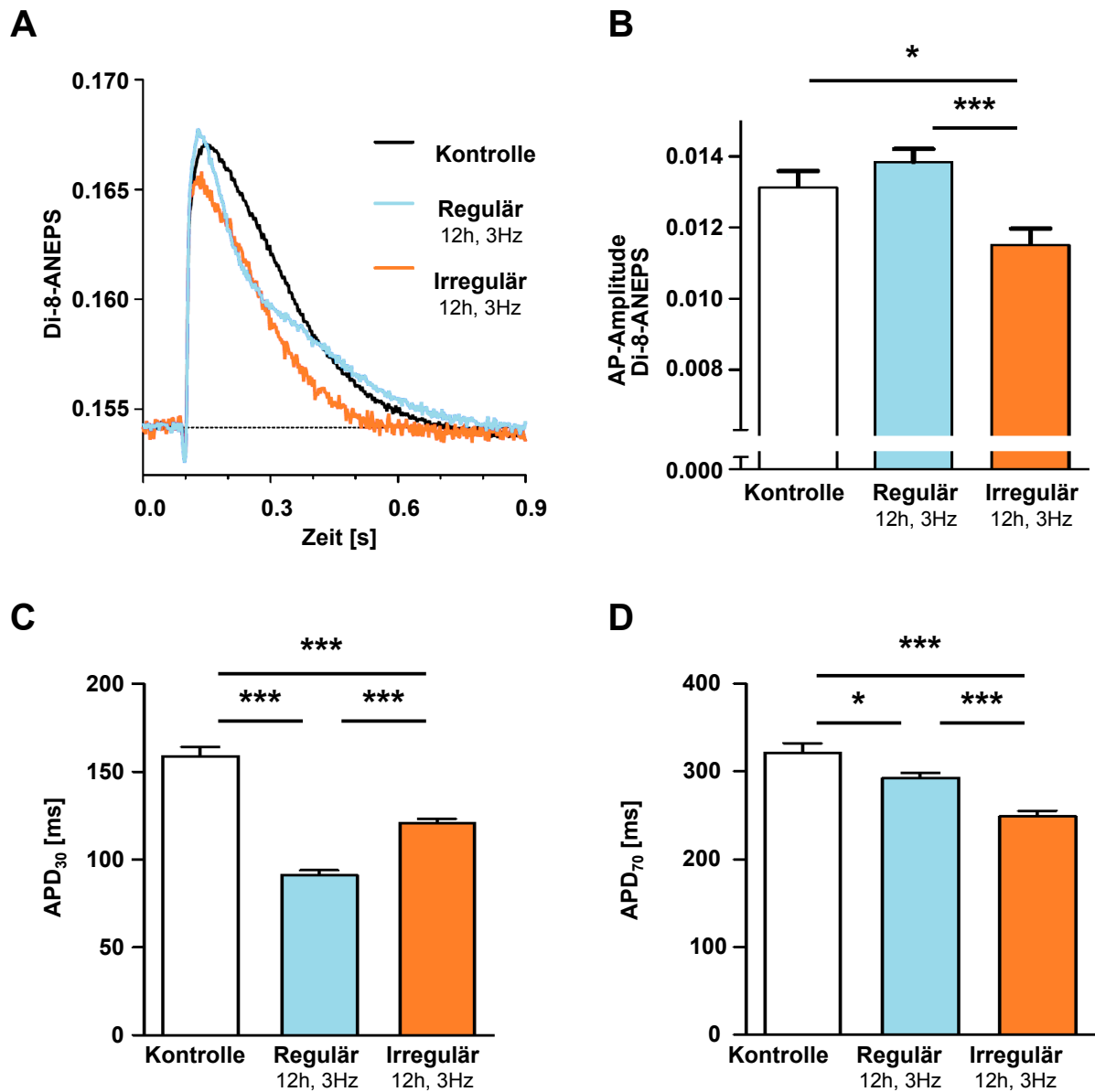


Abb. 17: Optische Messungen an Aktionspotentialen von kultivierten Kardiomyozyten. Optische Messungen von Aktionspotentialen (AP) bei 1 Hz Stimulationsfrequenz ergaben eine reduzierte APD₃₀ und APD₇₀ bei irregulärer Stimulation (**A,C und D**), sowie eine Abnahme der AP-Amplitude bei irregulärer Stimulation (**B**) (n=8; *p < 0,05; ***p < 0,001).

7.3 Bei irregulär stimulierten neonatalen Rattenkardiomyozyten ist die Phosphorylierung der Calmodulin Kinase II und der AMP-aktivierten Proteinkinase gesteigert

Lassen sich nach irregulärer Stimulation im Zellkulturmodell vergleichbare Veränderungen des Stoffwechsels wie sie bei VHF auftreten nachweisen? Die Western-Blot Analysen wurden analog zu den Versuchen an humanen Vorhöfen durchgeführt. Die α_2 -Untereinheit der AMP-aktivierten Proteinkinase (α_2 -AMPK), ein wichtiger Regulator des Energiehaushaltes, beeinflusst wichtige Schlüsselenzyme verschiedener Stoffwechselwege und wird unter anderem durch die Calmodulin-Kinase (CaMKII) reguliert. Die Expression von CaMKII und AMPK blieb durch Stimulation unverändert (Daten nicht aufgeführt). Die Phosphorylierung der CaMKII (Phosphorylierungsstelle Thr286) war nach irregulärer Stimulation auf $28 \pm 6\%$ ($n=9$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$) (Abb. 18 A), die Phosphorylierung der AMPK (Phosphorylierungsstelle Thr172) auf $54 \pm 29\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert ($n=12$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$) (Abb. 18 B). Im Zellkulturmodell zeigten sich bezüglich der metabolischen Veränderungen nach irregulärer Stimulation ähnliche Ergebnisse wie sie in humanen Kardiomyozyten bei VHF auftraten.

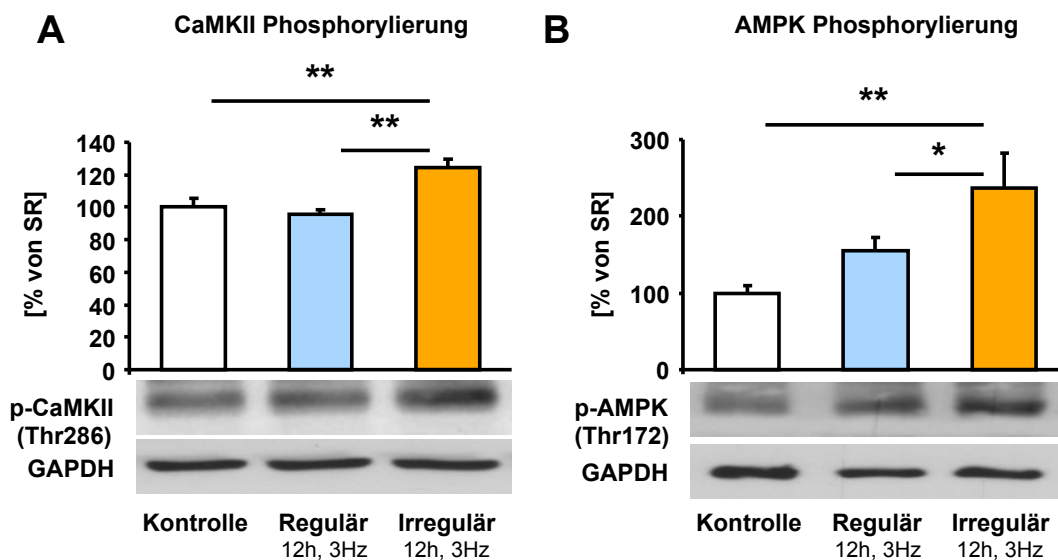


Abb. 18: Gesteigerte Phosphorylierung der Calmodulinkinase II und der AMP-aktivierten Proteinkinase bei irregulär stimulierten Kardiomyozyten. Repräsentative Western-Blots und Quantifizierung von Kardiomyozyten nach Stimulation. Durch irreguläre Stimulation stieg die Phosphorylierung der CaMKII (Phosphorylierungsstelle Thr286; $n=9$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$) (A) und der AMPK (Phosphorylierungsstelle Thr172; $n = 12$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$) an (B). (jeweils auf die GAPDH standardisiert).

7.4 Myokardialer Fettsäuremetabolismus bei irregulärer Stimulation

7.4.1 Nach irregulärer Stimulation war die Membrantranslokation des Fettsäuretransporters CD36 und die Aufnahme von Fettsäuren bei neonatalen Rattenkardiomyozyten gesteigert

Sind die Ergebnisse der Versuche an humanen Kardiomyozyten bezüglich des Lipidstoffwechsels mit den Ergebnissen im Zellkulturmodell nach irregulärer Stimulation vergleichbar und lässt sich eine gesteigerte Fettsäureaufnahme nachweisen? Nach irregulärer Stimulation über 12 h bei 3 Hz zeigten sich in den Kardiomyozyten keine Änderung der Expression des Fettsäuretransporters (CD36) (Abb. 19 A). Im Gegensatz zur Expression konnte bei der Membran/Cytosol Translokation von CD36 eine signifikante Steigerung nach irregulärer Stimulation beobachtet werden. Das Membran/Cytosol Verhältnis stieg nach irregulärer Stimulation über 12 h mit 3 Hz in Bezug zu den Kontrollen auf $167 \pm 20\%$ ($n=6-8$; $**p < 0,01$) an (Abb. 19 B). Es zeigten sich also vergleichbare Ergebnisse zu den Versuchen an humanen Kardiomyocyten. Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Membrantranslokation von CD36 einen Einfluss auf die Fettsäureaufnahme hat, wurde radioaktive ^{14}C -Palmitoyl-Säure in das Nährmedium der Kardiomyozyten gegeben und die CPM (Zerfälle pro Minute) gemessen. Bei irregulär über 12 h mit 3 Hz stimulierten Zellen wurde sowohl eine signifikante Zunahme der Aufnahme von ^{14}C -Palmitoyl-Säure im Vergleich zu den Kontrollzellen auf $120 \pm 4\%$ ($n=5-6$; $*p < 0,05$) als auch eine signifikante Zunahme im Vergleich zu den regulär stimulierten Kardiomyozyten auf $123 \pm 3\%$ ($n=5-6$; $**p < 0,01$) beobachtet (Abb. 19 C). Zusammenfassend konnte im Zellkulturmodell nach irregulärer Stimulation ein gesteigertes Membran/Cytosol Verhältnis von CD36 und eine gesteigerte Fettsäureaufnahme gezeigt werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch bei humanen Kardiomyocyten mit VHF gezeigt werden.

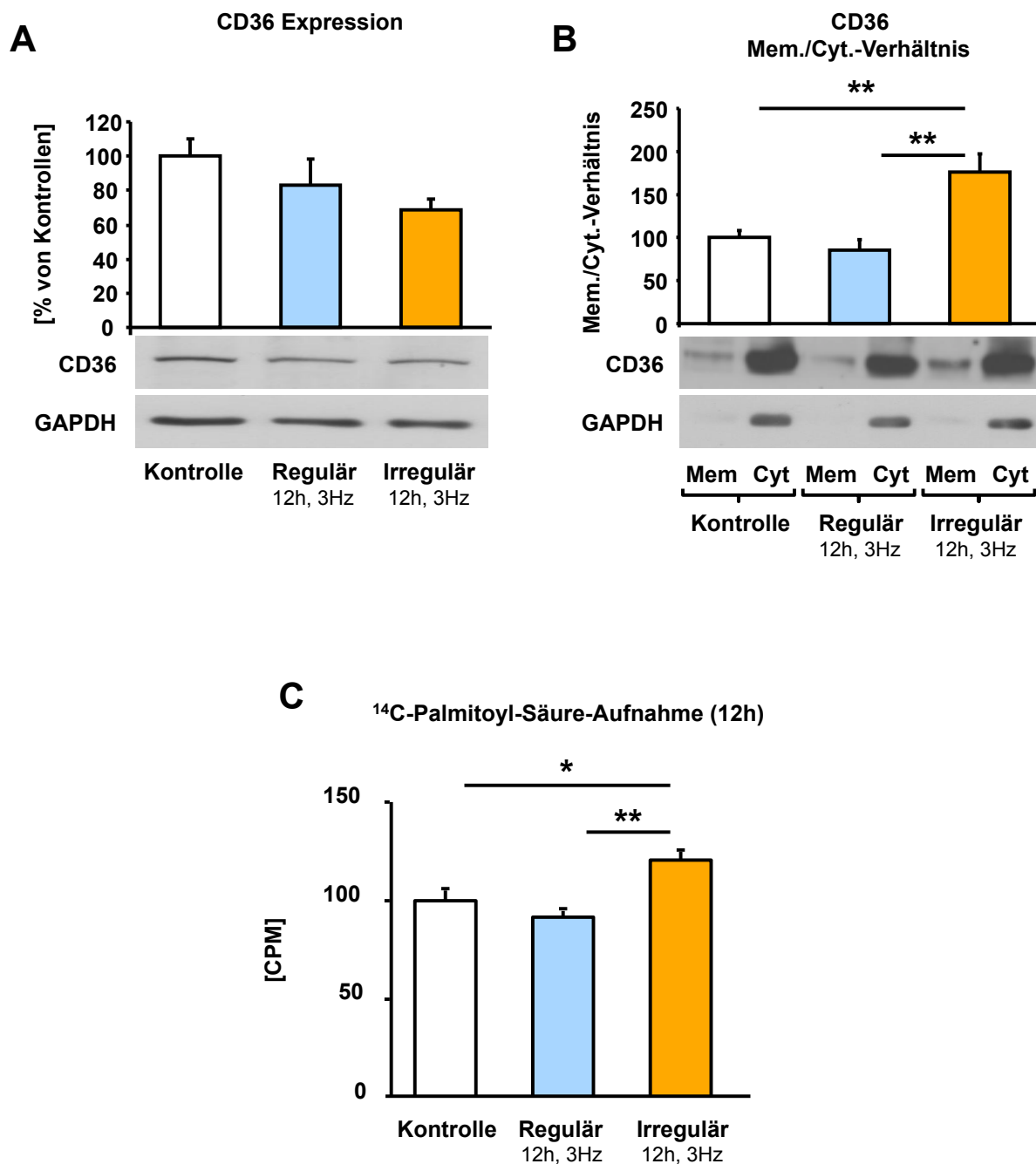


Abb. 19: Unveränderte Expression und gesteigerte Membrantranslokation des Fettsäuretransporters CD36 und gesteigerte Fettsäureaufnahme bei stimulierten Kardiomyozyten. Repräsentative Western-Blots und Quantifizierung von Kardiomyozyten nach Stimulation. Keine Signifikante Änderung der Expression von CD36 nach Stimulation ($n = 6$; n.s.) (A), gesteigertes Mem./Cyt.-Verhältnis von CD36 ($n = 6 - 8$; $**p < 0,01$) (B) und gesteigerte ^{14}C -Palmitoyl-Säure Aufnahme ($n = 5-6$ pro Gruppe; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$) der Kardiomyozyten nach Stimulation (gemessen durch die CPM = Zerfälle pro Minute). (auf die GAPDH standardisiert).

7.4.2 Irreguläre Stimulation reduziert die Phosphorylierung der Acetyl-CoA Carboxylase

Kann auch im Zellkulturmodell eine verminderte Phosphorylierung der Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) gezeigt werden? Die gesteigerte Aufnahme von Fettsäuren konnte sowohl bei Vorhofflimmern (VHF) in humanen Vorhofproben, als auch nach irregulärer Stimulation von Kardiomyozyten beobachtet werden. Die Phosphorylierung der ACC (Phosphorylierungsstelle Ser79) war bei irregulärer Stimulation auf $60 \pm 8\%$ ($n=8$; $*p < 0,05$) im Vergleich zu den Kontrollen und auf $47 \pm 7\%$ ($n=8$; $*p < 0,05$) im Vergleich zu regulärer Stimulation reduziert (Abb. 20). Vergleichbar mit den Ergebnissen bei humanen Kardiomyozyten mit VHF war die Phosphorylierung der ACC nach irregulärer Stimulation reduziert.

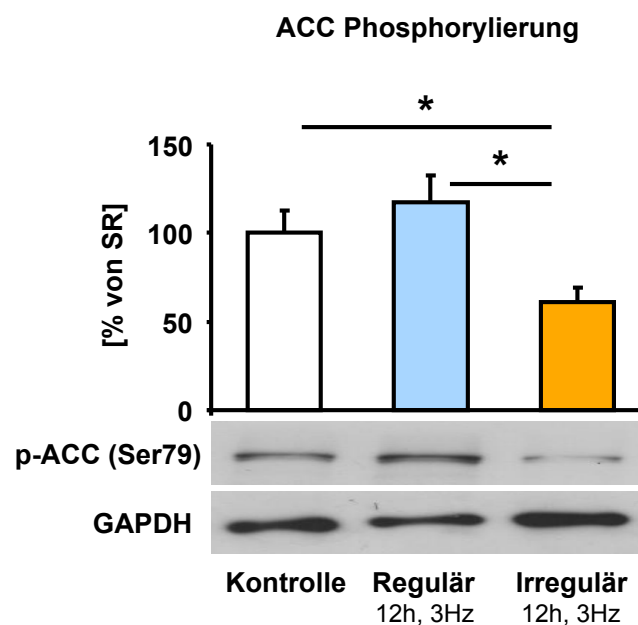


Abb. 20: Reduzierte Phosphorylierung der ACC in neonatalen Kardiomyozyten nach regulärer und irregulärer Stimulation. Repräsentative Western-Blots und Quantifizierung von Kardiomyozyten nach Stimulation (jeweils $n=6-8$). Reduzierte Phosphorylierung der ACC an der Phosphorylierungsstelle Ser79 ($*p < 0,05$). (auf GAPDH standardisiert).

7.5 Myokardialer Glukosemetabolismus bei irregulärer Stimulation

7.5.1 Irreguläre Stimulation von neonatalen Rattenkardiomyozyten reduziert deren Expression von SNAP-23, das Membran/Cytosol Verhältnis von GLUT4 und die globale Glukoseaufnahme

Sind die Ergebnisse der Versuche an humanen Kardiomyozyten bezüglich des Glukosestoffwechsels mit den Ergebnissen im Zellkulturmodell nach irregulärer Stimulation vergleichbar und lässt sich eine gesteigerte Glukoseaufnahme nachweisen? Die Glukoseaufnahme wird unter anderem über SNAP-23 einem zur Fusion der GLUT4 Vesikel mit der Plasmamembran benötigten Proteinkomplex beeinflusst. Nach 12 h Stimulation mit 3 Hz konnte in irregulär stimulierten Zellen eine reduzierte Expression von SNAP-23 auf $75 \pm 10\%$ beobachtet werden ($n=6-8$; $*p < 0,05$) (Abb. 21 A). Zur Quantifizierung der Glukoseaufnahme wurde der Glukosetransporter GLUT4 untersucht. Bei regulärer Stimulation konnte eine gesteigerte Expression von GLUT4 (1F8) auf $141 \pm 19\%$ ($n=6-8$; $*p < 0,05$), bei irregulärer Stimulation sogar auf $293 \pm 33\%$ ($n=6-8$; $***p < 0,001$), verglichen mit den Kontrollen, beobachtet werden (Abb. 21 B). Nach irregulärer Stimulation der Kardiomyozyten mit 3 Hz über 12 h konnte ebenso eine reduzierte Membran/Cytosol Translokation von GLUT4 (1F8) auf $62 \pm 12\%$ ($n=6-8$; $*p < 0,05$) in Bezug zu den Kontrollen und auf $63 \pm 13\%$ ($n=6-8$; $*p < 0,05$) in Bezug auf regulär stimulierte Zellen gezeigt werden (Abb. 21 C). Zum Nachweis der Glukoseaufnahme wurde ^3H -Glukose in das Nährmedium der Kardiomyozyten gegeben und die Zerfälle pro Minute gemessen. Bei irregulär über 12 h mit 3 Hz stimulierten Zellen konnte eine signifikante Abnahme der Glukoseaufnahme sowohl im Vergleich zu den Kontrollzellen auf $48 \pm 3\%$ ($n=5$; $*p < 0,05$) als auch im Vergleich zu den regulär stimulierten Kardiomyozyten auf $64 \pm 3\%$ ($n=5$; $**p < 0,01$) beobachtet werden (Abb. 21 D). Zusammenfassend konnte im Zellkulturmodell nach irregulärer Stimulation eine reduzierte Expression von SNAP-23, eine gesteigerte Expression von GLUT4 und eine reduzierte Membran/Cytosol Translokation von GLUT4 gezeigt werden. Die Glukoseaufnahme war nach irregulärer Stimulation vermindert. Auch diese Ergebnisse konnten bei humanen Kardiomyocyten mit VHF gezeigt werden.

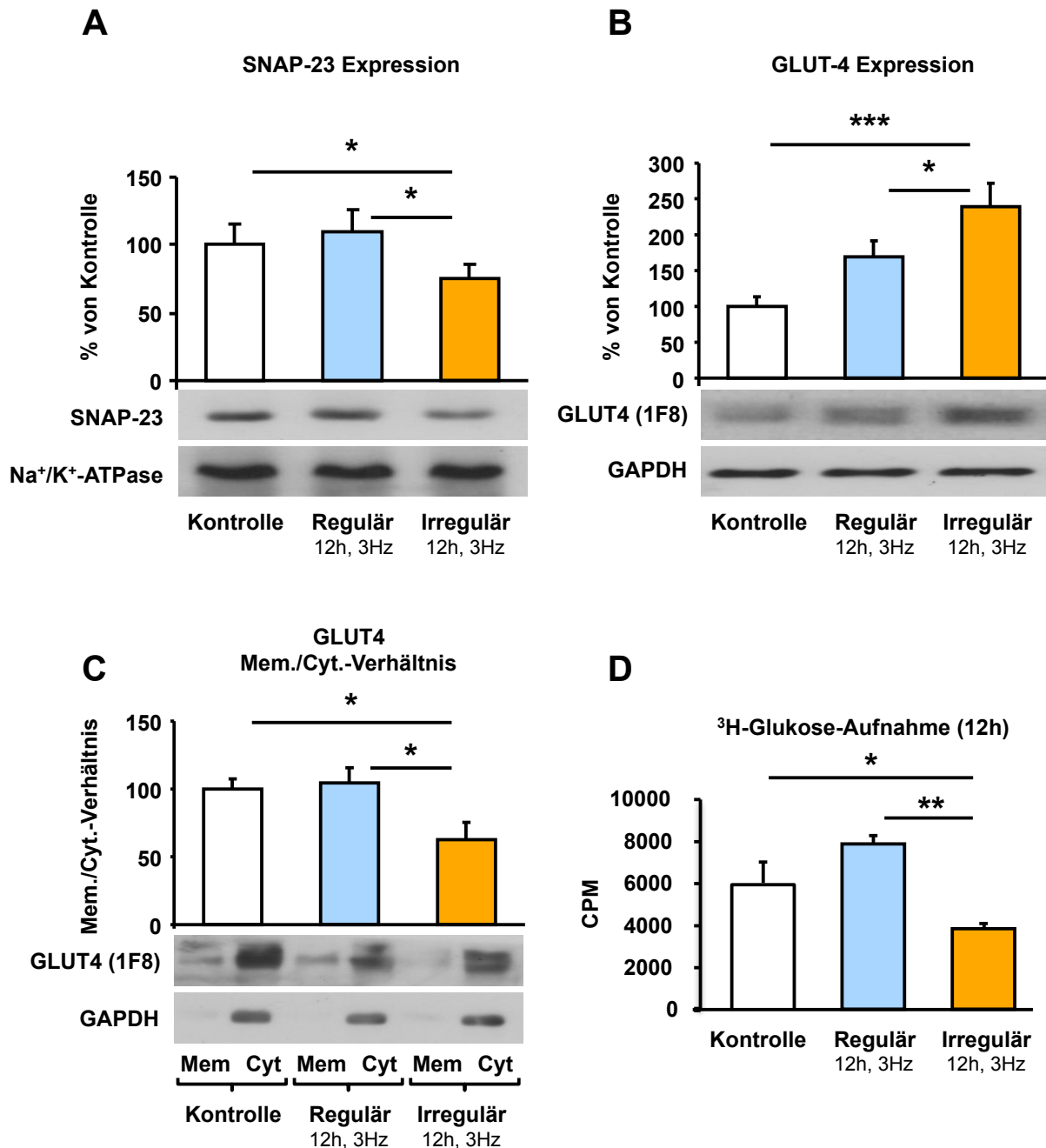


Abb. 21: Die Expression von SNAP-23, das Membran/Cytosol Verhältnis von GLUT4 und die Aufnahme von ³H-Glukose von Kardiomyozyten war nach Stimulation reduziert, die GLUT4 Expression gesteigert. Jeweils Repräsentative Western-Blots und Quantifizierungen von Kardiomyozyten nach Stimulation. Expression von SNAP-23 (n=6-8; *p < 0,05) (A), Expression von GLUT4 (n = 6-8; *p < 0,05 ; ***p < 0,001) (B), Mem./Cyt.-Verhältnis von GLUT4 (n = 6-8; *p < 0,05) (C) und Glukoseaufnahme von ³H-Glukose gemessen über die CPM (Zerfälle pro Minute) von Kardiomyozyten nach Stimulation (n=5 pro Gruppe; *p < 0,05; **p < 0,01) (D). (GLUT4 auf die GAPDH, SNAP-23 auf die Na⁺/K⁺-ATPase standardisiert).

8 Diskussion

Diese Studie zeigt, dass als Folge einer Arrhythmie sowohl in linken humanen Vorhöfen als auch in isolierten Kardiomyozyten spezifische metabolische Veränderungen auftreten. Diese metabolischen Veränderungen sind durch Änderungen des Fettsäurestoffwechsels mit Lipidakkumulation und des Glukosestoffwechsels mit reduzierter Aufnahme von Glukose und gesteigerter Glykogensynthese charakterisiert. Induziert werden diese Veränderungen durch einen gesteigerten diastolischen Ca^{2+} -Gehalt, eine gesteigerte Phosphorylierung der Calmodulin-Kinase II (CaMKII) und eine Zunahme der Aktivität der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK). Sie korrelieren mit einer Steigerung der proapoptotischen Signalkaskade und einem myokardialen Remodeling der Vorhöfe. Das Remodeling der Vorhöfe bei VHF geht mit Änderungen der Struktur und der elektrischen Erregung einher. Neben den strukturellen und elektrischen Änderungen treten bei VHF auch metabolische Veränderungen auf.

Irreguläre Stimulation induziert elektrisches Remodeling in Kardiomyozyten

Um die Auswirkungen einer Arrhythmie auf den kardiomyozytären Fett- und Glukosemetabolismus zu untersuchen, wurde ein Zellkulturmodell etabliert, welches neonatale Rattenkardiomyozyten mittels Feldstimulation sowohl regulär als auch irregulär stimuliert. Bei einer Frequenz von 3 Hz konnte unter lichtmikroskopischer Kontrolle nach jedem Impuls eine effektive Kontraktion von mindestens 80 % aller Myozyten sichergestellt werden. Bei irregulärer Stimulation wurde durch eine pseudo-randomisierte Abstimmung der Frequenzkontrolle, bei der jeweiligen Frequenz mit 50 % Abweichung die gleiche Impulszahl wie bei regulärer Stimulation generiert. Um die Bildung toxischer Elektrophoreseprodukte zu minimieren, wechselte die Polarität nach jeder Einzelstimulation und die Impulsdauer und Feldstärke wurden unterhalb schädigender Grenzwerte gewählt⁸¹. Mit Hilfe dieses Modells können wir in isolierten Kardiomyozyten von Ratten vergleichbare elektrophysiologische Veränderungen, wie sie in humanen Zellen mit VHF zu finden sind, zeigen und reproduzieren.

Die Dauer der Aktionspotentiale (APD) und die atriale effektive Refraktionszeit (AERP) sind bei humanen Kardiomyozyten mit VHF vermindert ^{17,15}. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch bei der Messung von APD und AERP der irregulär stimulierten Zellen. Die Ergebnisse werden sowohl bei den regulär als auch irregulär stimulierten Zellen, nach zwölfstündiger Stimulation mit 3 Hz beobachtet. Die Veränderungen der APD und AERP halten auch nach Beendigung der regulären oder irregulären Stimulation weiter an.

Eine wichtige Rolle beim elektrischen Remodeling des VHF spielt ein gesteigerter diastolischer Ca^{2+} -Gehalt ¹³. In unserem Zellkulturmodell ist der diastolische Ca^{2+} -Gehalt nach einer irregulären Stimulation über 12 h gesteigert. In regulär stimulierten und in spontan kontrahierenden Zellen hingegen bleibt der diastolische Ca^{2+} -Gehalt unverändert. Das diastolische Ca^{2+} ist dabei in den irregulär stimulierten Zellen sehr schnell (bereits nach 5 min.) und langanhaltend gesteigert. Die Änderung der APD, der AERP und des diastolischen Ca^{2+} -Gehalts in unserem Zellkulturmodell spiegeln wichtige Charakteristika des elektrischen Remodelings bei humanem VHF wieder.

Eine absolute Arrhythmie induziert metabolisches Remodeling

Die AMPK ist ein zentrales Enzym zur Regulation der Energiehomöostase ^{88,89}. Aktiviert wird die AMPK durch AMP, CaMKII, oder direkt durch den Ca^{2+} -Gehalt ^{90,40,41}. VHF ist durch schnelle, arrhythmische Kontraktionen der Vorhöfe charakterisiert. Diese gesteigerte Arbeit führt zu einem gesteigerten Adenosinmonophosphat/ Adenosintriphosphat-Verhältnis (AMP/ ATP-Verhältnis) und einem gesteigerten diastolischen Ca^{2+} -Gehalt ^{13,91}.

Eine irreguläre Stimulation resultiert in einer Aktivierung der CaMKII und AMPK. Ein zentrales Zielenzym der AMPK, die Fettsäuretranslokase (CD36), ist am Herzen mit einem Anteil von bis zu 80 % an der Aufnahme von Fettsäuren beteiligt ^{92,46}. Die Membrantranslokation der CD36 ist nach irregulärer Stimulation gesteigert, daraus resultiert eine gesteigerte Aufnahme von ¹⁴C-Palmitoyl-Säure. In den Gewebeproben linker humaner Vorhöfe konnte eine gesteigerte Expression und Phosphorylierung der CaMKII bei VHF im Gegensatz zu SR gezeigt werden ¹⁴.

Bei VHF zeigt sich in unseren humanen Gewebeproben linker Vorhöfe zusätzlich eine Aktivierung der AMPK und eine Steigerung der Membrantranslokation der CD36. Ein weiteres wichtiges Zielenzym der AMPK ist die Acetyl-CoA Carboxylase (ACC). Über eine AMPK abhängige Phosphorylierung der ACC wird die Oxidation von Fettsäuren und so die Synthese von Malonyl-CoA reduziert. In kardialen Myozyten ist Malonyl-CoA ein potenter Inhibitor der CPT1, die für die Aufnahme von Fettsäuren ins Mitochondrium unerlässlich ist ^{30,93,94}. Obwohl die Expression der AMPK gesteigert ist, ist die Phosphorylierung der ACC in humanen Gewebeproben linker Vorhöfe vermindert, was in einer verminderten β -Oxidation resultiert. Wenn das Angebot an Fettsäuren die Kapazität der Verwertung in der zellulären Oxidation übersteigt, werden sie in Lipide, z.B: Triglyceride oder Ceramide, konvertiert. Über diesen Mechanismus führt ein Überangebot an Fettsäuren zu einer Lipotoxizität ^{95,96}. Der Gehalt an adipose differentiation-related protein (ADRP), einem sensitiven Marker für Lipidakkumulation ^{86,52}, ist in den Proben humaner Vorhöfe mit VHF erhöht.

Lipidakkumulation ist mit reduzierter Glukoseaufnahme in Skeltett- und Herzmuskel assoziiert. Durch Lipidakkumulation nimmt die Membrantranslokation des synaptosomal-assoziiated-protein 23 (SNAP-23) ab ⁹⁷. SNAP-23 beeinflusst den Glukosetransporter GLUT4, der zusammen mit GLUT1 vorrangig für die Glukoseaufnahme im Myokard verantwortlich ist. GLUT1 ist hierbei für die basale Glukoseaufnahme im Herz zuständig und die Expression ist weitgehend konstant. GLUT4 hingegen ist im Myokard für die Anpassung der Glukoseaufnahme an verschiedene Stoffwechsellagen verantwortlich ⁹⁸. Eine verminderte Expression von SNAP-23 führt zu einer verminderten Membrantranslokation von GLUT4 ^{45,99}. In Gewebeproben von linken Vorhöfen ist bei Patienten mit VHF die Expression von SNAP-23 reduziert und die Membrantranslokation von GLUT4 vermindert. Die AMPK abhängige Expression von GLUT4 ist bei VHF gesteigert. Analog zu den humanen Vorhofproben ist die Membrantranslokation von SNAP-23 nach irregulärer Stimulation im Gegensatz zu regulärer oder spontaner Kontraktion vermindert. Die irreguläre Stimulation reduziert auch die Membrantranslokation von GLUT4, dies kann durch eine verminderte Aufnahme von ³H-Glukose gezeigt werden.

Gewebeproben humaner, linker Vorhöfe von Patienten mit Vorhofflimmern zeigen einen gesteigerten Glykogengehalt

Unsere Ergebnisse zeigen einen gesteigerten Gehalt an Glykogen in Gewebe von Patienten mit VHF^{99,100}. Die genaue Aufgabe der AMPK bei der Speicherung von Glykogen ist bis heute nicht ganz verstanden. Die AMPK ist in der Lage, die Glykogen-Synthase zu hemmen und die Glykogen-Phosphorylase zu stimulieren. Auf der anderen Seite steigert eine wiederholte Aktivierung der AMPK den Glykogengehalt^{89,88}.

Entsprechend ist in Gewebeproben von Patienten mit VHF die Proteinkinase-B (Akt) abhängige Phosphorylierung der GSK-3 und damit ein weiterer Weg zur Speicherung von Glykogen gesteigert^{101,102}.

Limitationen der Studie

Jede Methode unserer Studie, sowohl die Untersuchungen an humanen Vorhofproben als auch das Zellkulturmodell, hat spezifische Stärken aber auch Schwächen. Trotz sorgfältiger Auswahl der humanen Proben kann ein systematischer Fehler beim Auswählen oder Anwerben der Studienteilnehmer nicht ausgeschlossen werden. Die Stimulationen im Zellkulturmodell werden an ventrikulären Kardiomyozyten von neonatalen Ratten durchgeführt. Wie in verschiedenen Experimenten gezeigt werden konnte sind die Ergebnisse von Untersuchungen an atrialen Zellen vergleichbar mit denen an ventrikulären Zellen. Die Anzahl an Tieren, von denen Vorhofzellen isoliert werden müssten um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen steht nicht im Verhältnis zu den zu erwartenden Ergebnissen und ist nicht praktikabel.

In der Zusammenschau unserer Ansätze ist jedoch eine klare, übereinstimmende und einheitliche Änderung der metabolischen Regulation zu erkennen.

Zusammenfassung

Zusammenfassend induziert eine irreguläre Stimulation schnell und langanhaltend grundlegende Änderungen von Lipid- und Glukosestoffwechsel. Hierbei kommt es zu charakteristischen Veränderungen, vergleichbar mit den Ergebnissen humaner Vorhofproben mit VHF. Da unsere irreguläre Stimulation von kultivierten Kardiomyozyten zu vergleichbaren elektrischen und metabolischen Änderungen führt wie sie in humanen Gewebeproben mit VHF beschrieben sind, scheint unser experimentelles Modell ein geeignetes Forschungsmodell für VHF darzustellen.

VHF ist durch eine gesteigerte Aufnahme von Fettsäuren und eine verminderte β -Oxidation charakterisiert. Daraus resultiert eine Akkumulation von Lipiden. Diese Lipidakkumulation führt über eine verminderte Membrantranslokation von GLUT4 zu einer reduzierten Aufnahme von Glukose (Abb. 1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zusätzlich zum strukturellen und elektrischen Remodeling auch ein „metabolisches Remodeling“ an der Pathogenese von VHF beteiligt ist. Um diese Hypothese zu kräftigen bedarf es weiterer Forschungsarbeit.

9 Literaturverzeichnis

1. Nattel, S. & Opie, L. H. Controversies in atrial fibrillation. *Lancet* **367**, 262–72 (2006).
2. Limone, B. L., Baker, W. L., Kluger, J. & Coleman, C. I. Novel anticoagulants for stroke prevention in atrial fibrillation: a systematic review of cost-effectiveness models. *PLoS One* **8**, e62183 (2013).
3. Yu, W. C. *et al.* Reversal of atrial electrical remodeling following cardioversion of long-standing atrial fibrillation in man. *Cardiovasc. Res.* **42**, 470–6 (1999).
4. Hobbs, W. J. *et al.* Reversal of atrial electrical remodeling after cardioversion of persistent atrial fibrillation in humans. *Circulation* **101**, 1145–51 (2000).
5. Rensma, P. L., Allessie, M. A., Lammers, W. J., Bonke, F. I. & Schalij, M. J. Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circ. Res.* **62**, 395–410 (1988).
6. Allessie, M. A. Atrial electrophysiologic remodeling: another vicious circle? *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **9**, 1378–93 (1998).
7. Moe, G. K. & Abildskov, J. A. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *Am. Heart J.* **58**, 59–70 (1959).
8. Moe, G. K., Rheinboldt, W. C. & Abildskov, J. A. A Computer Model of atrial fibrillation. *Am. Heart J.* **67**, 200–20 (1964).
9. Wells, J. L. *et al.* Characterization of atrial fibrillation in man: studies following open heart surgery. *Pacing Clin. Electrophysiol.* **1**, 426–38 (1978).
10. Konings, K. T. *et al.* High-density mapping of electrically induced atrial fibrillation in humans. *Circulation* **89**, 1665–80 (1994).
11. Wijffels, M. C., Kirchhof, C. J., Dorland, R. & Allessie, M. A. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* **92**, 1954–68 (1995).
12. Allessie, M., Ausma, J. & Schotten, U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* **54**, 230–46 (2002).
13. Neef, S. *et al.* CaMKII-dependent diastolic SR Ca^{2+} leak and elevated diastolic Ca^{2+} levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ. Res.* **106**, 1134–44 (2010).

14. Dobrev, D. & Wehrens, X. H. T. Calmodulin kinase II, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak, and atrial fibrillation. *Trends Cardiovasc. Med.* **20**, 30–4 (2010).
15. Yue, L. *et al.* Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ. Res.* **81**, 512–25 (1997).
16. Franz, M. R., Karasik, P. L., Li, C., Moubarak, J. & Chavez, M. Electrical remodeling of the human atrium: similar effects in patients with chronic atrial fibrillation and atrial flutter. *J. Am. Coll. Cardiol.* **30**, 1785–92 (1997).
17. Schotten, U., Verheule, S., Kirchhof, P. & Goette, A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol. Rev.* **91**, 265–325 (2011).
18. Morillo, C. A., Klein, G. J., Jones, D. L. & Guiraudon, C. M. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* **91**, 1588–95 (1995).
19. Ausma, J. *et al.* Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* **96**, 3157–63 (1997).
20. Van der Velden Hmw *et al.* Atrial fibrillation in the goat induces changes in monophasic action potential and mRNA expression of ion channels involved in repolarization. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **11**, 1262–9 (2000).
21. Schotten, U. *et al.* Electrical and contractile remodeling during the first days of atrial fibrillation go hand in hand. *Circulation* **107**, 1433–9 (2003).
22. Manning, W. J. *et al.* Impaired left atrial mechanical function after cardioversion: relation to the duration of atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **23**, 1535–40 (1994).
23. Logan, W. F., Rowlands, D. J., Howitt, G. & Holmes, A. M. Left atrial activity following cardioversion. *Lancet* **2**, 471–3 (1965).
24. Manning, W. J. *et al.* Impaired left atrial mechanical function after cardioversion: relation to the duration of atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **23**, 1535–40 (1994).
25. Manning, W. J. *et al.* Temporal dependence of the return of atrial mechanical function on the mode of cardioversion of atrial fibrillation to sinus rhythm. *Am. J. Cardiol.* **75**, 624–6 (1995).
26. Kalifa, J. *et al.* Energetic metabolism during acute stretch-related atrial fibrillation. *Mol. Cell. Biochem.* **317**, 69–75 (2008).
27. White, C. W., Kerber, R. E., Weiss, H. R. & Marcus, M. L. The effects of atrial fibrillation on atrial pressure-volume and flow relationships. *Circ. Res.* **51**, 205–15 (1982).

28. Remondino, A. *et al.* Altered expression of proteins of metabolic regulation during remodeling of the left ventricle after myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**, 2025–34 (2000).
29. De las Fuentes, L. *et al.* Myocardial fatty acid metabolism: independent predictor of left ventricular mass in hypertensive heart disease. *Hypertension* **41**, 83–7 (2003).
30. Kudo, N. *et al.* Characterization of 5'AMP-activated protein kinase activity in the heart and its role in inhibiting acetyl-CoA carboxylase during reperfusion following ischemia. *Biochim. Biophys. Acta* **1301**, 67–75 (1996).
31. Da Silva, C. G., Jarzyna, R., Specht, A. & Kaczmarek, E. Extracellular nucleotides and adenosine independently activate AMP-activated protein kinase in endothelial cells: involvement of P2 receptors and adenosine transporters. *Circ. Res.* **98**, e39–47 (2006).
32. Holmes, B. F., Kurth-Kraczek, E. J. & Winder, W. W. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J. Appl. Physiol.* **87**, 1990–5 (1999).
33. Hardie, D. G., Carling, D. & Halford, N. Roles of the Snf1/Rkin1/AMP-activated protein kinase family in the response to environmental and nutritional stress. *Semin. Cell Biol.* **5**, 409–16 (1994).
34. Li, J. *et al.* Activation of AMPK alpha- and gamma-isoform complexes in the intact ischemic rat heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H1927–34 (2006).
35. Yan, H., Zhang, D., Zhang, Q., Wang, P. & Huang, Y. The activation of AMPK in cardiomyocytes at the very early stage of hypoxia relies on an adenine nucleotide-independent mechanism. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **5**, 770–6 (2012).
36. Hawley, S. A. *et al.* Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 27879–87 (1996).
37. Davies, S. P., Helps, N. R., Cohen, P. T. & Hardie, D. G. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* **377**, 421–5 (1995).
38. Fryer, L. G. D. *et al.* Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem. J.* **363**, 167–74 (2002).

39. Russell, R. R. *et al.* AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J. Clin. Invest.* **114**, 495–503 (2004).
40. Towler, M. C. & Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.* **100**, 328–41 (2007).
41. Raney, M. A. & Turcotte, L. P. Evidence for the involvement of CaMKII and AMPK in Ca²⁺-dependent signaling pathways regulating FA uptake and oxidation in contracting rodent muscle. *J. Appl. Physiol.* **104**, 1366–73 (2008).
42. Halse, R., Fryer, L. G. D., McCormack, J. G., Carling, D. & Yeaman, S. J. Regulation of glycogen synthase by glucose and glycogen: a possible role for AMP-activated protein kinase. *Diabetes* **52**, 9–15 (2003).
43. Luiken, J. J. F. P. *et al.* Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* **52**, 1627–34 (2003).
44. Lo chuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D. L., Jaswal, J. S. & Stanley, W. C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol. Rev.* **90**, 207–58 (2010).
45. Luiken, J. J. F. P. *et al.* Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters. *Pflugers Arch.* **448**, 1–15 (2004).
46. Luiken, J. J. F. P. *et al.* Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* **52**, 1627–34 (2003).
47. Löffler, P. E. Petrides, P. C. Heinrich (eds) (2006). *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Auflage, Springer, Heidelberg 2006, S. 368–370
48. Thampy, K. G. Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart. *J. Biol. Chem.* **264**, 17631–4 (1989).
49. Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. & Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* **1**, 15–25 (2005).
50. Hardie, D. G., Hawley, S. A. & Scott, J. W. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J. Physiol.* **574**, 7–15 (2006).
51. Ducharme, N. A. & Bickel, P. E. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* **149**, 942–9 (2008).

52. Brasaemle, D. L. *et al.* Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* **38**, 2249–63 (1997).
53. McGarry, J. D. & Dobbins, R. L. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* **42**, 128–38 (1999).
54. Schaffer, J. E. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr. Opin. Lipidol.* **14**, 281–7 (2003).
55. Unger, R. H. Lipotoxic diseases. *Annu. Rev. Med.* **53**, 319–36 (2002).
56. Stanley, W. C., Recchia, F. A. & Lopaschuk, G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.* **85**, 1093–129 (2005).
57. Ingwall, J. S. & Weiss, R. G. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ. Res.* **95**, 135–45 (2004).
58. Studelska, D. R., Campbell, C., Pang, S., Rodnick, K. J. & James, D. E. Developmental expression of insulin-regulatable glucose transporter GLUT4. *Am. J. Physiol.* **263**, E102–6 (1992).
59. Russell, R. R., Bergeron, R., Shulman, G. I. & Young, L. H. Translocation of myocardial GLUT4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol.* **277**, H643–9 (1999).
60. St-Denis, J. F. & Cushman, S. W. Role of SNARE's in the GLUT4 translocation response to insulin in adipose cells and muscle. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **9**, 153–65 (1998).
61. Calakos, N. & Scheller, R. H. Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular description. *Physiol. Rev.* **76**, 1–29 (1996).
62. Randhawa, V. K. *et al.* VAMP2, but not VAMP3/cellubrevin, mediates insulin-dependent incorporation of GLUT4 into the plasma membrane of L6 myoblasts. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2403–17 (2000).
63. Widberg, C. H., Bryant, N. J., Girotti, M., Rea, S. & James, D. E. Tomosyn interacts with the t-SNAREs syntaxin4 and SNAP-23 and plays a role in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* **278**, 35093–101 (2003).
64. Nascimben, L. *et al.* Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart. *Hypertension* **44**, 662–7 (2004).
65. Marsin, A. S. *et al.* Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.* **10**, 1247–55 (2000).

66. Wang, J. *et al.* Reduced cardiac fructose 2,6 bisphosphate increases hypertrophy and decreases glycolysis following aortic constriction. *PLoS One* **8**, e53951 (2013).
67. Krebs, E. G. & Fischer, E. H. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 150–7 (1956).
68. Callow, M., Morton, A. & Guppy, M. Marathon fatigue: the role of plasma fatty acids, muscle glycogen and blood glucose. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **55**, 654–61 (1986).
69. Sjödín, B. & Svedenhag, J. Applied physiology of marathon running. *Sports Med.* **2**, 83–99
70. Kassiotis, C., Rajabi, M. & Taegtmeyer, H. Metabolic reserve of the heart: the forgotten link between contraction and coronary flow. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **51**, 74–88
71. Zhai, P. & Sadoshima, J. Glycogen synthase kinase-3 β controls autophagy during myocardial ischemia and reperfusion. *Autophagy* **8**, 138–9 (2012).
72. Wolf, C. M. *et al.* Reversibility of PRKAG2 glycogen-storage cardiomyopathy and electrophysiological manifestations. *Circulation* **117**, 144–54 (2008).
73. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–57 (1972).
74. Hockenbery, D., Nuñez, G., Millman, C., Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S. J. bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**, 334–6 (1990).
75. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–6 (1992).
76. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501–12 (1999).
77. Kajstura, J. *et al.* Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am. J. Physiol.* **271**, H1215–28 (1996).
78. Mallat, Z. *et al.* Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1190–6 (1996).
79. Xu, G.-J. *et al.* Accelerated fibrosis and apoptosis with ageing and in atrial fibrillation: Adaptive responses with maladaptive consequences. *Exp. Ther. Med.* **5**, 723–729 (2013).
80. Bosch, R. F. *et al.* Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* **44**, 121–31 (1999).

81. Tovar, O. & Tung, L. Electroporation and recovery of cardiac cell membrane with rectangular voltage pulses. *Am. J. Physiol.* **263**, H1128–36 (1992).
82. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–75 (1951).
83. Kohlhaas, M. *et al.* Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation* **121**, 1606–13 (2010).
84. Kohlhaas, M. & Maack, C. Adverse bioenergetic consequences of Na⁺-Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ influx in cardiac myocytes. *Circulation* **122**, 2273–80 (2010).
85. Kaestner, L. *et al.* Isolation and genetic manipulation of adult cardiac myocytes for confocal imaging. *J. Vis. Exp.* **31**, 1433 (2009).
86. Mak, K. M., Ren, C., Ponomarenko, A., Cao, Q. & Lieber, C. S. Adipose differentiation-related protein is a reliable lipid droplet marker in alcoholic fatty liver of rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **32**, 683–9 (2008).
87. Neef, S. *et al.* CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ. Res.* **106**, 1134–44 (2010).
88. Arad, M., Seidman, C. E. & Seidman, J. G. AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease. *Circ. Res.* **100**, 474–88 (2007).
89. Dyck, J. R. B. & Lopaschuk, G. D. AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J. Physiol.* **574**, 95–112 (2006).
90. Frederich, M. & Balschi, J. A. The relationship between AMP-activated protein kinase activity and AMP concentration in the isolated perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* **277**, 1928–32 (2002).
91. Morillo, C. A., Klein, G. J., Jones, D. L. & Guiraudon, C. M. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* **91**, 1588–95 (1995).
92. Kuang, M., Febbraio, M., Wagg, C., Lopaschuk, G. D. & Dyck, J. R. B. Fatty acid translocase/CD36 deficiency does not energetically or functionally compromise hearts before or after ischemia. *Circulation* **109**, 1550–7 (2004).
93. Kudo, N., Barr, A. J., Barr, R. L., Desai, S. & Lopaschuk, G. D. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* **270**, 17513–20 (1995).

94. Dyck, J. R. *et al.* Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5'-AMP activated protein kinase. *Eur. J. Biochem.* **262**, 184–90 (1999).
95. Zhou, Y. T. *et al.* Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1784–9 (2000).
96. McAuliffe, J. J., Perry, S. B., Brooks, E. E. & Ingwall, J. S. Kinetics of the creatine kinase reaction in neonatal rabbit heart: an empirical analysis of the rate equation. *Biochemistry* **30**, 2585–93 (1991).
97. Peters, C. G., Miller, D. F. & Giovannucci, D. R. Identification, localization and interaction of SNARE proteins in atrial cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **40**, 361–74 (2006).
98. Fischer, Y. *et al.* Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J. Biol. Chem.* **272**, 7085–92 (1997).
99. Boström, P. *et al.* The assembly of lipid droplets and its relation to cellular insulin sensitivity. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 981–5 (2009).
100. Ausma, J. *et al.* Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* **96**, 3157–63 (1997).
101. Hajdуч, E., Litherland, G. J. & Hundal, H. S. Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett.* **492**, 199–203 (2001).
102. Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785–9

10 Dank

Diese Doktorarbeit ist durch das Zusammenwirken, durch die Unterstützung und das Verständnis vieler besonderer Menschen entstanden. Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei denjenigen Menschen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet und mich dabei geprägt haben.

Meinem Doktorvater Professor Dr. med. Ulrich Laufs, der mir diese interessante Arbeit ermöglicht hat, möchte ich für die Anregungen und kritischen Kommentare danken. Er stand mir immer mit seinem Fachwissen und seiner Erfahrung zur Seite und hatte in schwierigen Phasen jederzeit eine offene Tür.

Mein Betreuer Dr. med. Mathias Lenski hat mich durch seine Begeisterung an unserem Projekt immer wieder neu motiviert. Er hat viele freie Abende für mich geopfert und wurde nicht zuletzt auch durch private Gespräche zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter.

Die Mitarbeiter des kardiologischen Forschungslabors, allen voran die medizinisch-technischen Assistentinnen Ellen Becker, Simone Jäger und Catrin Pittke und Dr. Michael Kohlhaas, haben mich während meiner Promotionsphase begleitet und standen mir immer mit Rat und Tat zu Seite.

Viele Freunde haben dazu beigetragen, dass die letzten Jahre eine wirkliche Bereicherung für mich darstellen. Besonders Joachim Löffler, Kai Lindner und Dr. Mathias Hohl danke ich für den neutralen Blick von Außen und dafür, dass sie mir immer Mut gemacht haben.

Meiner Freundin Kris Kerwer, die immer für mich da war, mich in den richtigen Momenten neu motiviert hat und immer an mich geglaubt hat, danke ich für ihr Verständnis und den beständigen Rückhalt.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern Klaus und Christina Schleider, die mir mein Studium ermöglicht haben, meiner Schwester Theresa Schleider und meiner gesamten Familie. Ihre liebevolle und unermüdliche Unterstützung auch in schwierigen Phasen hat mich immer ermutigt weiter zu machen. Auf sie kann ich mich immer verlassen. Vielen Dank!